

UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION DES
SIS - ONKOGENS IN TUMORKULTURZELLEN

CLAUS FAHRER



Disbui. München
1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Aus dem Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und
medizinische Mikrobiologie der Universität München**

Vorstand: Prof.Dr.F.Deinhardt

**Untersuchungen zur Expression des SIS-Onkogens
in Tumorkulturzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Claus Fahrer

aus

Landau/Pfalz

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K. von der Helm

Mitberichterstatter : 1. Prof. Dr. F. Deinhardt
2. Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.1988

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsangabe

1. EINLEITUNG

- 1.1. Wachstumsfaktoren
- 1.2. Das SIS-Gen und der Wachstumsfaktor PDGF
- 1.3. Die Onkogene MYC und FOS

2. MATERIAL UND METHODEN

- 2.1. Kulturzellen
- 2.2. Gewebekulturen
- 2.3. RNA- Untersuchungen
 - 2.3.1.1. RNA Screening Untersuchung mittels Natriumjodid-Methode =("Dot Blot")
 - 2.3.1.2. "Dot Blot" (Quick Blot)-Methode
 - 2.3.2. RNA Untersuchung der Kulturzellen mittels "Northern Blot"-Analyse
 - 2.3.2.1. RNA Extraktion
 - 2.3.2.2. Oligo-dT Affinitätschromatographie
 - 2.3.2.3. Formaldehyd-Agarosegele
 - 2.3.2.4. "Northern Blot"
 - 2.3.2.5. Hybridisierung
 - 2.3.2.5.1. Verwendete Proben und deren Isolation
 - 2.3.2.5.2. Radioaktive Markierung durch " Nick- Translation"
 - 2.3.2.5.3. Hybridisierung der RNA Nitrozellulosefilter
 - 2.4. Protein-Untersuchungen
 - 2.4.1. Markierung der Zellproteine mit ³⁵S-Methionin
 - 2.4.2. Isolierung und Analyse von Proteinen durch Immunpräzipitation
 - 2.4.2.1. Antiseren

- 2.4.2.2. Immunpräzipitation zellgebundener SIS-spezifischer Proteine
- 2.4.2.3. Immunpräzipitation sezernierter SIS-spezifischer Proteine der Medienüberstände der Kulturzellen
- 2.4.3. Elektrophoretische Auftrennung
- 2.4.3.1. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS/Page)

3. ERGEBNISSE

- 3.1. Untersuchungen zur Expression der Produkte des c-SIS Gens und der Transkripte des c-MYC und c-FOS Gens in den verwendeten Kulturzellen
 - 3.1.1. Auswahl der verwendeten Zellkulturen
 - 3.1.2. Methodischer Ablauf der Untersuchung
- 3.2. Nachweis von c-SIS mRNA in den Kulturzellen mittels Natriumjodid-Methode ("Dot Blot")
- 3.3. Untersuchungen zur Expression der Transkripte des c-SIS, c-MYC und c-FOS Gens in einigen Kulturzellen mit Hilfe des "Northern Blot" Verfahrens.
 - 3.3.1. c-SIS mRNA Expression
 - 3.3.2. c-MYC und c-FOS mRNA Expression
 - 3.3.3. Mengenabschätzung der aufgetrennten am Nitrocellulosefilter gebundenen mRNA nach Aktin-Hybridisierung
 - 3.3.4. Zusammenfassung der c-SIS, c-MYC und c-FOS Genexpression der untersuchten Kulturzellen
- 3.4. Proteinuntersuchung
 - 3.4.1. Nachweis eines v-SIS spezifischen Precursor Proteins in der SSV-transformierten Kontrollzelle SSV/SSAV.
 - 3.4.2. Nachweis eines c-SIS-spezifischen Proteins in den untersuchten Kulturzellen
 - 3.4.3. Untersuchung zur Sezernierung c-SIS-spezifischer Proteine durch die Kulturzellen

- 3.4.3.1. Immunpräzipitation SIS-spezifischer zellständiger und sezernierter Proteine aus Zellslysaten und korrespondierenden Zellkulturmedienüberständen einiger Kulturzellen
4. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER mRNA UND PROTEINUNTERSUCHUNGEN
5. DISKUSSION
- 5.1. Erläuterungen zur Expression von SIS-spezifischen Proteinen sowie der SIS, c-MYC und c-FOS Transkripte in den untersuchten Kulturzellen
6. ZUSAMMENFASSUNG
7. LITERATURVERZEICHNIS

Einleitung

Die Erforschung der durch malignes Zellwachstum bedingten Erkrankungen des Menschen ist in der heutigen Medizin ein Arbeitsgebiet von zentraler Bedeutung.

Neben chemischen und physikalischen Noxen, verursachen Viren maligne Neoplasien bei Mensch und Tier. Die Erforschung der Gene von RNA Tumroviren hat in den letzten Jahren in bemerkenswerter Weise zur Erkenntnis der Entstehung bösartiger Neubildungen beigetragen:

Im Genom zahlreicher RNA-Tumroviren gibt es neben den für die Virusreplikation notwendigen Genen ein spezifisches Gen, das virale Onkogen, das für die maligne Transformation der Wirtszelle verantwortlich ist.

Die Nukleotid-Sequenzen der viralen Onkogene sind von Virus zu Virus unterschiedlich, nachgewiesenermaßen haben jedoch alle eine onkogene Funktion. Die Entdeckung, daß sich weitgehend homologe Nukleotid-Sequenzen zu vielen dieser tumorauslösenden viralen Genen im Genom der meisten eukaryontischen Zellen von der Hefe (Marx, J.L. 1984) über die Fruchtfliege *Drosophila* (Shilo and Weinberg 1981) bis zu menschlichen Zellen (Spector et. al., 1978, Bishop and Varmus 1982) finden, folgte kurz darauf. Man nannte die homologen zellulären Sequenzen Proto-Onkogene. Diese Bezeichnung ist nicht glücklich gewählt, da man heute weiß, daß es sich bei ihnen um ureigene zelluläre Gene handelt, welche per se nicht onkogen wirken. Die Proto-Onkogene sind in ihrer Nukleotid-Sequenz im Laufe der Evolution über viele Spezies des Tierreichs stark konserviert geblieben. Die hohe Konserviertheit der Proto-Onkogene verstärkte die Vermutung, daß sie essentielle Aufgaben im Organismus erfüllen. Vermutlich haben die Proto-Onkogene Aufgaben bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen der Zelle, was sich u.a. durch die bisherigen Untersuchungen ihrer Gen-Expression zu bestätigen scheint. Wahrscheinlich werden Proto-Onkogene nur in bestimmten Zellen und auch nur zu gewissen Zeitpunkten geweblicher bzw. zellulärer Entwicklung exprimiert (Müller und Verma 1984, Müller et al., 1982 Bishop 1983 b). Es ist unwahrscheinlich, daß die primäre Eigenschaft solch wichtiger hochkonservierter in allen eukaryontischen Zellen vorkommender Gene darin besteht, gesunde in maligne Zellen umzuwandeln.

Es stellt sich vielmehr die Frage, ob ein Proto-Onkogen unter besonderen Bedingungen, ebenso wie das virale Onkogen, in der Lage sein könnte, transformierende Eigenschaften in der Zelle zu entfalten. Tatsächlich finden sich Hinweise, die für eine solche Möglichkeit sprechen. Vom Burkitt Lymphom ist z. B. bekannt, daß eine chromosomale Translokation der malignen Entartung der Ursprungszelle zugrunde liegt. Bei dieser chromosomalen Translokation gelangt ein Proto-Onkogen (c-MYC) in die Nachbarschaft anderer Gen-Sequenzen, in diesem Fall unter den Einfluß eines stark aktivierten Immunglobulin-Promotors. Der Promotor ist verantwortlich für das Ausmaß der Transkription und führt somit zu der starken Induktion der Proto-Onkogenexpression.

Ein ähnlicher Effekt, genannt "Promotor-Insertion", findet sich auch bei der Infektion von Zellen durch Retroviren die kein Onkogen besitzen. Die Wirtszelle wird transformiert und auch hier findet man ein aktiviertes Proto-Onkogen (Neel et al. 1981, Nusse and Varmus 1982). Die Proto-Onkogenaktivierung erfolgt nach der Retrovirusinfektion über den starken viralen Promotor LTR, der zusammen mit der Virus DNA in die zelluläre DNA aufgenommen wird. Hier führt der LTR-Promotor des Virus, durch Zufall in der Nähe des Proto-Onkogens integriert, zur verstärkten Expression dieses Gens. Die Wirtszelle wurde also, ohne daß ein virales Onkogen in sie integriert wurde, durch die verstärkte Expression ihres eigenen Proto Onkogens transformiert.

Neben Experimenten mit Viren ist es möglich, Kulturzellen durch Transfektion mit DNA die aus Tumorzellen gewonnenen wurde, zu transformieren. Transfektion bedeutet die Einschleusung einer isolierten DNA in das Genom einer Zelle. Die Tumorzellen aus der die DNA für das Transfektionsexperiment isoliert wurde, waren durch chemische Agentien transformiert worden, ein viraler Einfluß auf die maligne Entartung war daher auszuschließen. Die Untersuchung der durch die Transfektion aktivierten zellulären Gene zeigte, daß es sich bei diesen Genen zum Teil wiederum um Proto-Onkogene handelte (Der et al., 1982, Parada et al., 1982, Santos et al., 1982, McCoy et al., 1983, Shimizu et al., 1983). Bis heute fehlt zwar ein wirklicher Beweis, daß neoplastisches Wachstum seine kausale Ursache in aktivierten Proto Onkogenen haben kann (Duesberg 1985), die Vielzahl der bis heute gefundenen Hinweise sprechen jedoch stark für die erwähnte Hypothese. Die gewonnenen Erkenntnisse gaben ferner zu zwei Überlegungen Anlaß:



Einerseits ist es denkbar, daß eine abnorm gesteigerte Expression des Proto-Onkogens, durch welche Umstände auch immer ausgelöst, mit einer daraus resultierenden erhöhten Konzentration des Genprodukts, zu zellmetabolischen Prozessen führt, die die maligne Transformation der Zelle induzieren (quantitative Hypothese).

Andererseits könnte durch eine Mutation des Proto-Onkogens das normalerweise physiologisch wirksame Genprodukt eine veränderte und möglicherweise karzinogene Wirkung hervorrufen (qualitative Hypothese).

Es gibt Hinweise, daß möglicherweise erst im Zusammenspiel mehrerer aktivierter Proto Onkogenen eine Entwicklung einsetzt, an deren Ende die Tumorzelle steht.

So scheinen in einigen Fällen zwei Proto-Onkogene notwendig zu sein um eine gesunde Zelle vollständig zu transformieren. Aktiviert man nur ein Proto-Onkogen in der Zelle, so wird die Zelle zwar immortalisiert, sie zeigt aber nicht die Veränderungen, die für eine komplette Transformation typisch sind. Wird nun ein zweites bestimmtes Proto-Onkogen in solch immortalisierte Zellen aktiviert, so werden diese irreversibel transformiert (Marx J.L., 1983). Diese Ergebnisse gaben zu der Vermutung Anlaß, daß die Tumorentstehung kein plötzliches zellpathologisches Ereignis darstellt, sondern daß die maligne Entartung einer Zelle stufenweise erfolgt. Die Aktivierung einzelner Proto-Onkogene wären hierbei die Zwischenschritte. Der Mechanismus der Transformation wäre also vergleichbar physiologischen Systemen wie z.B. der Gerinnungskaskade, die gleichfalls einem Stufenschema folgen.

Um die Mechanismen der Transformation besser verstehen zu lernen, muß sich das Augenmerk zwangsläufig auf die Expression und die Produkte der Onkogene richten, die sogenannten transformierenden Proteine. Von den über zwanzig verschiedenen bis heute bekannten viralen Onkogenen (v-onc) lassen sich bis jetzt vier Klassen von Onkogenprodukten unterscheiden:

1 a. Proteine mit Tyrosin Proteinkinase Aktivität (z.B. v-SRC, v-ABL, v-FPS, v-ROS, v-FES, v-YES, v-FGR)

1 b. Proteine mit Serin-/Threoninkinase Aktivität (z.B. v-MIL, v-RAF, v-MOS)

2. Proteine, die sehr nahe verwandt mit bekannten (z.B. v-SIS) zellulären Wachstumsfaktoren sind.
3. Proteine mit cytoplasmatischer GTP-Bindung und Adenylatcyclaseaktivität (z.B. v-HA-RAS, v-KI-RAS, v-N-RAS)
4. Proteine, die im Zellkern vorkommen und deren Funktion bisher unklar ist. (z.B. v-FOS, v-MYB, v-MYC, v-SKI)

Die vorliegende experimentelle Studie befaßt sich hauptsächlich mit dem SIS Onkogen das einerseits als virales Onkogen v-SIS des Simian Sarcoma Virus (SSV) und andererseits als c-SIS Proto-Onkogen vorkommt. Es kodiert für die B-Polypeptidkette des menschlichen Wachstumsfaktors PDGF (platelet derived growth factor). Aufgrund eines möglichen funktionellen Zusammenhangs der Expression der Proto-Onkogene c-MYC und c-FOS mit der Expression des SIS-Onkogens bzw des PDGF Wachstumsfaktors wurden auch Expressionsuntersuchungen dieser beiden Onkogene im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Im folgenden wird deshalb zunächst auf Wachstumsfaktoren mit möglicher onkogener Wirkung, dann auf das SIS-Onkogen bzw. sein Genprodukt den Wachstumsfaktor PDGF, und schließlich auf die Proto-Onkogene c-MYC und c-FOS näher eingegangen. Sie bilden die Grundlage der Fragestellung dieser Studie.

1.1. Wachstumsfaktoren

Eine sehr wesentliche Eigenschaft der Tumorzellen ist ihr unbegrenztes Wachstumsvermögen. Sie gehorchen nicht mehr oder nur noch teilweise bestimmten Regulationssystemen, die normale Zellen daran hindern, sich unkontrolliert zu teilen.

In den letzten Jahren sind mehrere solche Wachstumsfaktoren, PGF (polypleptide growth factors) genannt, isoliert und charakterisiert worden. Unter anderem wurde man auf sie durch ihr Vorhandensein in embryonalen Tierseren aufmerksam, die für das Wachstum von Kulturzellen in vitro notwendig sind. Es wird angenommen, daß sie in vivo für die Regulation des Zellwachstums und Differenzierung besonders während der Entwicklung eines Organismus von Bedeutung sind.

Zu den bestuntersuchten Wachstumsfaktoren gehören der bereits erwähnte Blutplättchenfaktor PDGF und der epidermale Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor). Die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren regt die sich in der Ruhe-Phase befindlichen Zellen an, in den Zellzyklus einzutreten und sich zu teilen.

Diese Faktoren übermitteln ihr Signal indem sie sich an spezifische in der Plasmamembran eingebettete Rezeptoren binden. Diese Rezeptoren sind zum Teil gewebsspezifisch. So findet sich der PDGF Rezeptor nur an Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie Gliazellen oder Fibroblasten. Grundsätzlich gibt es für derartige Faktoren drei Wege, um vom Ort ihrer Entstehung zu ihrer Zielzelle zu gelangen.

Der endokrine Weg: Faktoren werden von ihrer Produktionszelle in den Blutstrom entlassen und erreichen über diesen die Zielzellen.

Der parakrine Weg: Er unterscheidet sich vom endokrinen Weg dadurch, daß Ursprungs- und Bestimmungsort nahe beieinanderliegen und der Transport der Faktoren durch Diffusion erfolgt. Das hieße, daß PDGF sezernierende Zellen ihre Nachbarzellen zum Wachstum anregen.

Der autokrine Weg: Dieselbe Zelle, die einen Faktor produziert wird auch von diesem aktiviert. Diese Zelle stimuliert sich selbst zur Proliferation (Sporn + Todaro 1980, Todaro + Delarco 1978).

Die Unterscheidung der auto- oder parakrinen Übertragung ist in der Praxis nur schwer zu verfolgen, da experimentell kaum mit Einzelzellen zu arbeiten ist. Es soll deshalb in dieser Arbeit der Einfachheit halber der autokrine und parakrine Mechanismus nicht weiter differenziert werden. Tumorzellen in Zellkultur zeichnen sich im Gegensatz zu nicht malignen Zellen dadurch aus, daß sie weitgehend unabhängig von exogenen Wachstumsfaktoren werden, d.h. sie benehmen sich "wachstumsfaktorautonom". Es ist daher denkbar, daß aktivierte Proto-Onkogene den Tumorzellen diese Autonomie verleihen können. (Downward et al., 1984, Holley R.W. 1975).

Es wird deshalb spekuliert, daß die ständige Expression eines solchen Wachstumsfaktors durch einen autokrinen Mechanismus die Zelle in eine unphysiologische Dauerstimulation

bringt, die ein Teil der Reaktion sein könnte, welche zur malignen Transformation von Zellen führt (Sporn + Todaro 1980, Downward et al., 1984).

1.2. Das SIS-Gen und der Wachstumsfaktor PDGF

Ein entscheidender Hinweis auf die Beteiligung von Wachstumsfaktoren an malignen neoplastischen Prozessen, war die kürzliche Entdeckung, daß zwischen einer der beiden Polypeptidketten des Wachstumsfaktors PDGF eine 96%ige Sequenzhomologie zu dem transformierenden Proteinprodukt des Onkogens v-SIS des RNA Tumorvirus SSV (Simian Sarkoma Virus) besteht.

Durch Aminosäuresequenzierung konnte gezeigt werden, daß die 109 Aminosäuren der PDGF B-Kette zu ca 96% der Sequenz des transformierenden Proteins p28SIS des Simian Sarcom Virus (SSV) identisch sind (Aminosäure 67-175) (Waterfield et al., 1983, Doolittle et al., 1983, Johnsson et al., 1984).

Zum ersten Mal konnte somit die Verbindung zwischen dem transformierenden Genprodukt eines viralen Onkogens und der physiologischen Funktion des Proteinprodukts des entsprechenden zellulären Proto Onkogens, in diesem Fall des c-SIS Proto Onkogens aufgezeigt werden. Daher ist im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung von Tumorkulturzellen auf c-SIS /PDGF Expression ein zentrales Thema. Zunächst soll hier auf das Onkogen des Simian-Sarkom-Virus (v-SIS) eingegangen werden. Das Simian-Sarcoma-Virus (SSV), ist ein Primatenvirus, das aus dem Fibrosarkom eines Wolläffchens isoliert wurde (Theilen et al., 1971, Wolfe et al., 1971). SSV verursacht bei Marmosets je nach Injektionslokus Fibrosarkome (Wolfe et al., 1971) bzw. Gliome (Johnson et al., 1975).

Auch durch Infektion in der Zellkultur kann das SSV Virus Fibroblasten transformieren (Wolfe et al., 1972,). Epitheliale und endotheliale Zellen dagegen können durch das SSV Virus zwar infiziert, nicht aber transformiert werden (Henderson et al., 1974, Besmer et al., 1983, Leal et al., 1985). Das Onkogen des SSV Virus (v-SIS) hat eine Länge von 1,1 Kilobasen (Gelman et al., 1982). Die Analyse der mRNA von SSV-infizierten Zellen zeigt ein genomisches Transkript von 5,5 kb und eine subgenomische Form von 2,7 kb (Eva et al., 1982, Johnsson et al., 1985b).

Bei der Translation wird das vom viralen Onkogen kodierte Protein als p26-SIS im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Dieses Protein wird anschließend ebenfalls am endoplasmatischen Retikulum zum Glycoprotein gp28-SIS glykosiliert. Dieses gp28-SIS ist mehrfach als Precursor und transformierendes Proteinprodukt des v-SIS Onkogens beschrieben. Die in der Literatur für dieses Molekül übliche Schreibweise ist p28SIS. Sie wird im Folgenden statt gp28-SIS verwendet. Es folgt eine rasche Dimerisation zu einem gp56-SIS Dimer, mit nachfolgender Oligosaccharidmodifikation am Golgi Apparat. Die weitere Reifung des v-SIS-Genprodukts wird durch eine limitierte Proteolyse bestimmt, welche an der Plasmamembran erfolgt, dabei wird gp56-SIS zu einem gp 42-SIS abgebaut (Robbins et al., 1983, 1985). Das nächste Zwischenprodukt p35-SIS ist kein Glycoprotein mehr, genau wie das stabile dimere Endprodukt p24-SIS. P24-SIS hat C- und N-terminale Sequenzen verloren (Robbins et al., 1985). Dieses p24-SIS entspricht in Struktur und Wirkung einem PDGF B/B Homodimer. (Ein Schema dieser Spaltungsreifung findet sich in Abb. 1). Unter reduzierenden Bedingungen (Aufbrechen der Disulfidbrücken) bei der Proteinanalyse können neben dem Precursor p28SIS zwei Proteine von 20 und 11 Kilo dalton beobachtet werden (Robbins et al., 1983). Die bisher beschriebenen sezernierten v- und c-SIS-Proteine haben unter reduzierenden Bedingungen eine Größe von 11 und 13 K dalton (Johnsson et al., 1985 b, Shimokado et al., 1985).

Untersuchungen an SSV transformierten Fibroblasten (HF/SSV) haben allerdings gezeigt, daß nur ein geringer Teil der synthetisierten v-SIS-spezifischen Proteine sezerniert werden (Robbins et al., 1985). Dies führte zu dem Schluß, daß der Großteil der v-SIS Proteinprodukte an der Zellmembran assoziiert bleibt. Durch Rekombinations- und Transfektionsexperimente konnte bewiesen werden, daß das v-SIS Genprodukt transformierend wirkt (Gazit et al., 1984, Clark et al., 1984), und das außerdem nur das v-SIS Onkogen mit seinem Genprodukt für die Transformation der infizierten Zelle verantwortlich ist. Eine Wichtige, bis heute nicht ganz geklärte Frage ist, warum das v-SIS Proteinprodukt dies tut. Die Hauptkomponente der transformierenden Wirkung resultiert vermutlich aus der mitogenen Wirkung des v-SIS Proteinprodukts und PDGF, die sich aus der homologen Struktur beider Moleküle ergibt. Sie binden beide am PDGF Rezeptor und können in ihrer Wirkung durch PDGF Antikörper neutralisiert werden (Deuel et al., 1983, Johnsson et al., 1985a). Es erscheint daher wahrscheinlich, daß bei der malignen

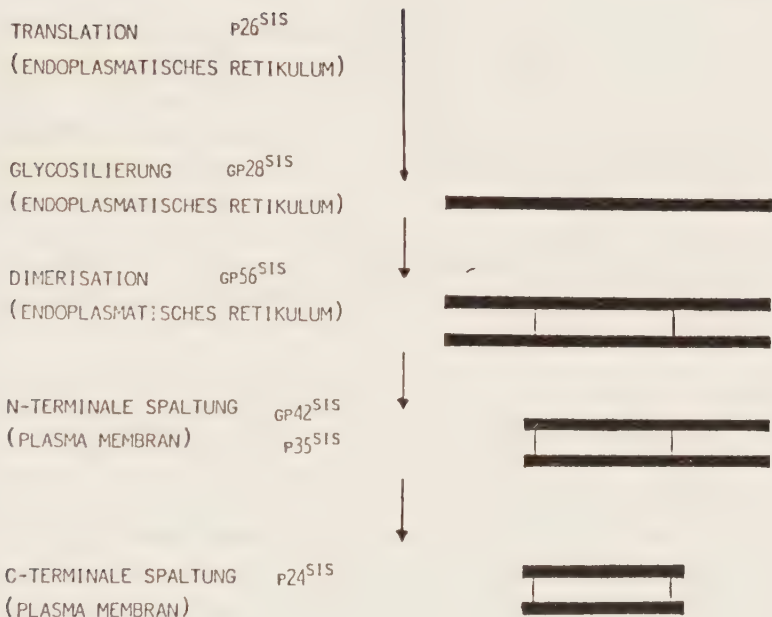


Abb. 1

Spaltungsreifung des v-SIS Genprodukts
(nach Robbins et al., 1985)

Transformation durch v-SIS ein autokrin/parakriner Wachstumsstimulationsmechanismus eine Rolle spielt. Hierfür spricht, daß nur Zellen die PDGF Rezeptoren besitzen durch SSV Infektion transformiert werden können.

Jüngste Forschungsergebnisse (Johnsson et al., 1985a) zeigten sogar, daß die Transformation und Proliferation von frisch SSV-infizierten Zellen *in vitro* durch PDGF-Antikörper kurzzeitig blockiert werden kann. Die Menge der von SSV transformierten Kulturzellen sezernierten v-SIS Proteinprodukte scheint darüberhinaus einen Einfluß auf die Stärke des Tumorstwachstums zu haben. So korreliert die Fähigkeit von SSV-transformierten Zellen, in nackten Mäusen zu wachsen, mit dem Ausmaß, mit dem sie einen PDGF-artigen Faktor produzieren und sezernieren.

Zellen mit geringer v-SIS/PDGF Sekretionsrate wuchsen spärlich im Gegensatz zu den Zellen mit einer starken Sekretion, welche sich in den nackten Mäusen stark vermehrten und große Tumore bildeten (Huang et al., 1984).

Durch die Erkenntnisse über den Zusammenhang des v-SIS Onkogens mit PDGF kreuzen sich die wissenschaftlichen Wege der PDGF-Wachstumsfaktorforschung und der Tumorstvirologie.

So wurde 1974 erstmals beobachtet, daß für einen Großteil der im Serum vorhandenen mitogenen Aktivität, die Freisetzung von Substanzen aus Blutplättchen verantwortlich ist.

Dies führte zu der Entdeckung des maßgeblich an der Wundheilung und Narbenbildung beteiligten Wachstumsfaktors "platelet derived growth factor" (PDGF) (Ross et al., 1977, Kohler and Lipton 1974). PDGF scheint in der Natur weit verbreitet zu sein. So findet sich auch in den Seren von Primaten und Fischen ein Faktor, der mit menschlichem PDGF um den Rezeptor kompetitiert (Singh et al., 1982). Menschliches PDGF wurde vor einigen Jahren rein isoliert (Antoniades et al., 1979, Heldin et al., 1979). PDGF ist ein basisches Protein (PK 9,8), hitze- (bis 100 °C) und säurebeständig. Zwei Hauptarten menschlichen PDGFs sind beschrieben.

PDGF I (31 bis 35 K dalton) und PDGF II (28 bis 32 K dalton). Beide haben die gleiche Affinität in Bio-, Radiorezeptor- und Radioimmuno-Assays (Huang et al., 1983). PDGF I und II sind Glycoproteine, die sich in ihrer Zuckerzusammensetzung unterscheiden (Deuel et

al., 1981). Reduzierende Agenzien inaktivieren beide Formen und zerlegen sie in kleinere Einheiten geringeren Molekulargewichts.

Obwohl die Kombination der Untereinheiten des menschlichen PDGFs noch nicht vollständig bekannt ist, wurde die grundsätzliche Beobachtung, daß es sich um ein über Schwefelbrücken gebundenes Dimer handelt (Heldin et al., 1979) von verschiedenen Wissenschaftlern bestätigt (Antoniades 1981, Deuel et al., 1981, Rains and Ross 1982). Wahrscheinlich handelt es sich beim menschlichen Plättchenfaktor PDGF um ein Heterodimer zweier Polypeptidketten A und B. Die Möglichkeit, daß menschliches PDGF eine Mischung zweier Homodimere (A/A und B/B) ist, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die drei möglichen Kombinationen der Ketten miteinander gleichermaßen biologisch aktiv sind (Betsholz et al., 1986). So besteht beispielsweise das thrombozytäre PDGF von Schweinen aus einem B/B Homodimer (Stroobant and Waterfield 1984).

Die Dimerstruktur des PDGF-Moleküls ist funktionell entscheidend, da bei der Auftrennung des Dimers unter reduzierenden Bedingungen die biologische Aktivität verloren geht (Betsholz et al., 1986). Zwischen der A-Kette und der B-Kette besteht überdies eine 60%ige Aminosäuresequenzhomologie (Johnsson et al., 1984). (zum Vergleich der Homologie siehe Abb. 2).

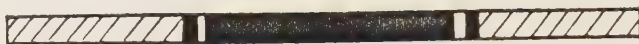
Man vermutet, daß die strukturellen Unterschiede der A- und B-Kette verschiedenen Funktionen in Bezug auf Stabilisierung des PDGFs, Speicherung, Sekretion und Bindung an die Zellmembran bzw. der Membranproteine dienen (Betsholz et al., 1986, Smith et al., 1982). Der Großteil des physiologisch im menschlichen Körper vorhandenen PDGFs ist in Thrombozyten gespeichert. Jedes menschliche Blutplättchen enthält ca. 10^3 Moleküle PDGF, welche in speziellen α Granula enthalten sind. Da Thrombozyten mangels eines Zellkerns nur bedingt zur Proteinsynthese in der Lage sind (Ryo et al., 1983), nimmt man an, daß PDGF in Megacaryozyten produziert wird, aus denen sich später die kernlosen Thrombozyten bilden.

Es finden sich jedoch noch andere Zellarten, die physiologischerweise PDGF produzieren. Zu ihnen zählen endotheliale Zellen (Fox and di Corleto 1984), Monozyten - Makrophagen (Shimokado et al., 1985, Martinet et al., 1986), der Cytotrophoblast der menschlichen Plazenta des ersten Trimenons (Goustin et al., 1985), sowie die glatte Muskelzelle der Rattenaorta (Seifert et al., 1984, Walker et al., 1984).

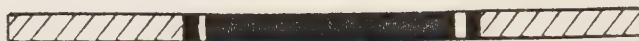
ANZAHL DER
AMINOSÄUREN

20 , 60 , 100 , 140 , 180 , 220

p28 SIS



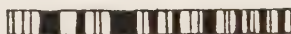
p28SIS



— ◇1

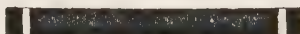
— ◇2

A-Kette



PDGF

B-Kette



= IDENTISCHE REGION



= NICHT IDENTISCHE REGION



= PROZESSIERTE REGION DES p28SIS

◇1

= ANTIGENE SEQUENZ DES
KANINCHENIMMUNSERUMS (anti-intern/SIS)

◇2

= ANTIGENE SEQUENZ DES
KANINCHENIMMUNSERUMS (anti-C-term./SIS)

Abb. 2

Molekulargröße und Sequenzhomologien von
gp²⁸SIS und PDGF.

(nach Heldin C.H. and Westermark B. 1984)

Seine biologische Bedeutung erhält PDGF durch die mitogene Wirkung die es auf Bindegewebszellen hat. Nach heutigem Wissen regt PDGF nur Fibroblasten, glatte Muskelzellen oder Gliazellen zur gesteigerten DNA-Synthese und somit zum Wachstum an (Ross et al., 1974, Sher et al., 1979, Heldin 1979, Westermark and Wasteson 1976), da nur mesenchymale Zellen einen Rezeptor für PDGF besitzen, der das mitogene Signal in die Zelle weiterleitet. Zwei weitere Eigenschaften des Moleküls sind noch erwähnenswert. Zum einen besitzt es noch eine chemotaktische Wirkung auf Bindegewebszellen (Ross 1986), zum anderen wirkt es stärker vasokonstriktiv als der klassische Vasokonstriktor Angiotensin II (Berk et al., 1986).

Von den physiologischen Aufgaben, die PDGF im Organismus erfüllt, ist bis heute neben seiner vermuteten Beteiligung an embryonalen- und Wachstums- Prozessen (Goustin et al., 1985), und insbesondere die Mitwirkung bei der Wundheilung und Narbenbildung (Kaplan et al., 1979, Stiles et al., 1983) bekannt. So wird bei Aggregation oder bei Kontakt von Thrombozyten mit benetzbaren Flächen, wie es beispielsweise bei Verletzungen der Fall ist, der Inhalt der thrombozytären Granula und damit PDGF freigesetzt.

Möglicherweise sind auch die PDGF produzierenden und sezernierenden Endothelzellen sowie Monozyten / Makrophagen an der Heilung und bindegewebigen Organisation von Verletzungen und Entzündungen beteiligt. So steigern zugrundegehende bzw. verletzte endotheliale Zellen Produktion und Sezernierung von PDGF um ein Vielfaches (Fox and di Corletto 1984). Im Plasma hat PDGF nach der Freisetzung nur eine geringe Halbwertszeit von ca. 2 Min. (Bowen Pope 1984a). Normalerweise ist es im menschlichen Plasma nicht nachweisbar. Daher ist anzunehmen, daß PDGF nur lokal begrenzt am Ort der Freisetzung wirkt, da es nur dort in ausreichender Konzentration vorhanden ist. Systemisch findet sich durch den schnellen Abbau des Moleküls keine für eine Wirkung ausreichende Konzentration. Eine für die lokale Wirkung ausreichende Konzentration von PDGF müßte daher ihre Grundlage neben der bekannten thrombozytären PDGF Freisetzung in einem para- oder autokrin/parakrinen Mechanismus von PDGF produzierenden und sezernierenden Zellen haben. Hinweise auf eine rein parakrine Stimulation ergeben sich aus der Produktion und Sekretion von PDGF durch Endothelzellen und Makrophagen/Monozyten. Da beide Zellarten keine Rezeptoren besitzen über die PDGF mitogen auf sie wirken könnte, regt das

von diesen Zellen sezernierte PDGF nur die sie umgebenden Bindegewebszellen parakrin zur Proliferation an.

Andere Beobachtungen deuten darauf hin, daß für PDGF auch ein physiologischer autokrin/parakriner Mechanismus im Organismus zu finden ist. Neuere Untersuchungen über PDGF oder PDGF verwandte Proteine in Zellen glatter Muskulatur der Aorta junger (Seifert et al., 1984) und verletzter (Walker et al., 1984) Ratten zeigten, daß die Zellen sehr junger Ratten bzw. Zellen von Ratten mit arteriellen Wandtraumen im Gegensatz zu Zellen erwachsener Ratten signifikante Mengen eines PDGF-artigen Faktors in ihr extrazelluläres Medium entlassen.

Es zeigt sich außerdem, daß die Erwachsenenzone mehr spezifische PDGF Rezeptoren besitzt als die Zelle einer jungen Ratte. Dies ist neben einem autokrinen/parakrinen Mechanismus bei der Reparatur von Gefäßwandtraumen mit einer entwicklungsabhängigen Regulation der zellulären Wachstumsstimulation bestimmter Gewebe wie Gefäßen durch den PDGF Faktor beim wachsenden Organismus vereinbar. Ähnlich der glatten Muskelzelle der Ratte produzieren auch embryonale Fibroblasten im Gegensatz zur Erwachsenenzone einen mitogenen Faktor, der in seiner Wirkung PDGF entspricht (Clemmons 1983).

Die im Cytotrophoblasten der menschlichen Plazenta des ersten Trimenons in Abhängigkeit des Gestationsalters schwankende Expression und Sezernierung PDGF-artiger Stoffe lassen auch für die menschliche Plazenta einen regulierten entwicklungsabhängigen autokrinen Mechanismus vermuten (Goustin et al., 1985), da der Cytotrophoblast ebenfalls PDGF Rezeptoren besitzt.

Aus diesen physiologischen Funktionen ergibt sich die Frage ob PDGF auch an pathologischen Prozessen beteiligt ist. In der Tat gibt es einige unterschiedliche Erkrankungen an deren Entstehung PDGF maßgeblich beteiligt sein könnte. Dies sind in erster Linie Erkrankungen bei denen sich die Proliferation von mesenchymalen Zellen wie z.B. Bindegewebszellen findet, da deren Wachstum durch PDGF stimulierbar ist. Als Beispiele wären hier die Atherosklerose, Lungenfibrosen, die chron. Polyarthritis (CP), die Proliferation ossären Gewebes bei der Osteomyelosklerose u.ä. zu nennen. Bei all diesen Erkrankungen sind PDGF produzierende Zellen im Spiel (Ross 1986). Bei der Atherosklerose z. B. findet man in veränderten Gefäßen u.a. proliferierende glatte Muskelzellen, die von viel

Bindegewebe umgeben sind. Da man weiß, daß endotheliale und glatte Muskelzellen bei Reizung oder Verletzung mit der Sezernierung von PDGF reagieren (Walker et al., 1984, Fox and di Corleto 1984) und sich in der entzündlich veränderten Gefäßwand Monozyten/Makrophagen und auch Thrombozyten angelagert finden, scheint es doch zumindest wahrscheinlich, daß PDGF an den morphologischen Veränderungen dieser Erkrankung beteiligt ist (Ross 1986). Auch bei vielen chronischen entzündlichen Erkrankungen wie z.B. den Lungenfibrosen findet man die Vermehrung des Bindegewebes. Wie bei allen Entzündungen sind auch hier die PDGF produzierenden Zellen Teil des entzündlichen Prozesses. Ein weiteres Beispiel einer Erkrankung mit einem möglichen pathologischen Effekt der PDGF Wirkung ist die Osteomyelosklerose. Als Sekundärerkrankung tritt sie im Gefolge myeloproliferativer Erkrankungen und chronischen Entzündungen auf. Histologisch ist die Hyperplasie des ossären Gewebes auffällig, welche zur Verdrängung des Knochenmarks und damit zum charakteristischen Bild dieser Erkrankung beiträgt. Nach Knochenmarkstransplantation ist dies Phänomen zum Teil reversibel (Smith et al., 1981). Bei den myeloproliferativen Erkrankungen die mit einer Osteomyelosklerose einhergehen, findet man häufig die Vermehrung von Monozyten und Megacaryozyten, weshalb diese Erkrankung auch als Megacaryozytäre Myelose bezeichnet wurde. Es ist daher denkbar, daß das monozytäre bzw. megacaryozytäre PDGF an der Proliferation ossären Gewebes bei der Osteomyelosklerose beteiligt ist.

Aus den durch das SSV-Virus bzw. v-SIS Gen gewonnenen Erkenntnissen ergab sich natürlich die Frage, ob das c-SIS Proto-Onkogen und damit PDGF an malignen neoplastischen Prozessen beteiligt ist, deren Ursache nicht in einer Virusinfektion zu suchen ist. Als sequenzhomologes Gegenstück zum v-SIS Gen konnte das c-SIS Proto-Onkogen genau wie andere per se nicht onkogene Proto-Onkogene im Genom gesunder Säugetier- und menschlicher Zellen nachgewiesen werden. (Dewar et al., 1982). Durch die Sequenzhomologie des v-SIS Genprodukts mit der PDGF B-Kette wurde klar, daß es sich beim c-SIS Proto-Onkogen um das die PDGF B-Kette kodierende zelluläre Gen handelt. Das c-SIS Gen besteht aus 6 Exons. Zusammen mit den Introns hat das Gen eine Größe von 24 kb. Das gereifte c-SIS Transkript also die mRNA hat eine Molekülgröße von 4,2 kb (Eva et al., 1983, Graves et al., 1984, Pantazis et al., 1985). Man vermutet, daß die Translation und die post-translationem Reifungsprozesse des c-SIS Proteinprodukts, also der PDGF B-Kette denen der v-SIS Proteinreifung entspricht. Über die Beteiligung des c-SIS Proto-Onkogens an malignen tumorösen Prozessen ist bis heute bekannt, daß tatsächlich in den durch PDGF mitogen stimulierbaren Kulturzellen überwiegend mesenchymaler Tumore, wie

Osteosarkomen (Eva et al., 1982, Heldin et al., 1980, Graves et al., 1983, Betsholz et al., 1983), Fibrosarkomen (Eva et al., 1982, Pantazis et al., 1985), Glioblastomen (Nister et al., 1984, Pantazis et al., 1985, Eva et al., 1982) und einem Rhabdomyosarkom (Betsholz et al., 1983), das c-SIS Transkript exprimiert wird.

In durch PDGF nicht mitogen stimulierbaren Tumorzellen anderer histogenetischer Herkunft, wie Karzinomen, Melanomen, Neuroblastomen und auch anderer Tumore (Eva et al., 1982, Betsholz et al., 1983, Zuelen 1985, Bowen Pope et al., 1984b, Nimann et al., 1984), sowie in gesunden erwachsenen Fibroblasten und Gliazellen (Eva et al., 1982, Betsholz et al., 1983), fanden sich bis heute bis auf einige leukämischen Kulturzellen (Blick et al., 1984) (Westin et al., 1982b, Ross 1986) keine eindeutigen Nachweise der c-SIS Proto-Onkogen Expression.

Als "Momentaufnahme" eines menschlichen mesenchymalen Tumors *in vivo* konnte auch in Tumorbiospien menschlicher Sarkome eine dem c-SIS-Proto-Onkogen homologe Messenger RNA von 4,2 kb Länge identifiziert werden (Rainer Brachmann, Dissertation, LMU).

Bei allen diesen Studien wurden aber vor allem die Transkriptions- und weniger die Translationsebenen der Expression untersucht. Daher wendet sich diese Arbeit besonders der Studie der Proteinsynthese zu.

In kürzlich nach experimenteller Anfertigung dieser Arbeit veröffentlichten Forschungsergebnissen wurde gezeigt, daß für die Produktion von PDGF-artigen Stoffe nicht nur das c-SIS Proto-Onkogen sondern auch ein Gen für die PDGF A-Kette verantwortlich ist (Betsholz et al., 1986). In einigen in dieser Studie untersuchten Sarkomkulturzellen wurde nur das c-SIS Transkript, in anderen das c-SIS Transkript und das Transkript der PDGF A-Kette nachgewiesen. In einer dritten Gruppe fand sich nur das Transkript der A-Kette.

In den nur das A-Ketten Transkript exprimierenden Tumorkulturzellen wurde ein Protein von 31 Kilo dalton immunpräzipitiert. Unter reduzierenden Bedingungen findet man zwei Monomere von 16,5 und 17 Kilo dalton (Betsholz et al., 1983). Es wurde daher vermutet, daß das bisher in den Zellkulturmedien von Tumorzellen mit anti-PDGF Antiseren präzipitierte Protein von 31 Kilo dalton einem A/A PDGF Homodimer entspricht (Betsholz et al., 1986). Da in den bisher beschriebenen Sarkomkulturzellen überwiegend dieses Protein nachgewiesen wurde, spekulierte diese Forschergruppe, daß die c-SIS / B-Ketten Proteine nicht oder nur

zu einem geringen Prozentsatz sezerniert werden. Ähnlich den v-SIS Proteinprodukten SSV-transformierter Zellen könnten die c-SIS Proteine zum Großteil membranassoziiert bleiben. Der Angriffspunkt der Wirkung der c-SIS Proteinprodukte könnte daher möglicherweise auch intrazellulär liegen. Die durch PDGF hervorgerufene Wachstumsdauerstimulation, der die PDGF permissive Zelle über einen auto/parakrinen oder intrazellulären Mechanismus bei PDGF Produktion durch sich selbst ausgesetzt ist, könnte zunehmend zu einer Dysregulation im Zellmetabolismus führen. Dieser Zelldysregulation könnten weitere Transformationsereignisse folgen. Die Aktivierung der Proto-Onkogene c-MYC und c-FOS deren Expression durch die Einwirkung von PDGF auf die Zelle induziert wird (Kelly et al., 1983), ist möglicherweise ein Bestandteil einer solchen zellulären Dysregulation. Ob es sich bei der Aktivierung dieser beiden Proto-Onkogene sogar um Schritte in einem Mehrstufenmechanismus der Transformation handelt, ist bis jetzt nicht geklärt. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Kulturzellen wurde daher neben der c-SIS Expression auch die Expression von c-MYC und c-FOS untersucht.

1.3. Die Onkogene MYC und FOS

Das v-MYC Onkogen findet sich im Genom des Avian Myelocytomatosus Virus MC 29. Das Virus selbst wurde 1964 entdeckt (Ivanov et al., 1964). Neben der Auslösung von Karzinomen, Sarkomen und Myelocytomen in Vögeln, kann das v-MYC Onkogen durch Infektion des MC 29 Retrovirus *in vitro* bei einer Reihe von Kulturzellen unterschiedlicher histogenetischer Herkunft eine maligne Transformation hervorrufen (Graf and Beug 1978). Wie für andere virale Onkogene existiert auch für das v-MYC Onkogen ein homologes zelluläres Proto-Onkogen (c-MYC) (Sheiness and Bishop 1979, Sheiness et al., 1980). Das vom c-MYC Proto-Onkogen kodierte c-MYC Transkript ist ein Molekül von 2,5-2,7 kb Länge (Sheiness et al., 1980, Westin et al., 1982, Eva et al., 1982). Das Proteinprodukt des c-MYC Proto Onkogens findet man im Zellkern (Abrams et al., 1982, Donner et al., 19882).

Über die physiologische Funktion dieses Moleküls im Zellkern ist noch wenig bekannt. Man findet die c-MYC Onkogen Expression insbesondere bei der Zellproliferation (Kelly et al., 1983). In den physiologisch stark proliferierenden Zellen der Hämatopoese z.B. ist das c-MYC Transkript in einer gegenüber anderen Geweben, wie Gehirn, Leber oder Muskel, um

10- 30 fach verstärkten Expression zu finden (Gonda et al., 1982).

Die c-MYC Expression fällt nach der Zelldifferenzierung stark ab (Gonda and Metcalf 1984). Dies könnte darauf hinweisen, daß dem c-MYC Proto-Onkogen eine zentrale Rolle bei der Zellproliferation und der Differenzierung von Zellen zukommt. Die Wirkung, die das MYC Proto-Onkogen im Rahmen maligner Neoplasien entfaltet, sind vermutlich auch in der Richtung der ursprünglichen physiologischen Aufgabe des c-MYC Proto Onkogens zu suchen. Eine Amplifikation bzw. vor allem erhöhte Expression des c-MYC-Gens wurde z.B. bei menschlichen Neoplasien wie dem Burkitt-Lymphom (Dalla Favera et al., 1982, Taub et al., 1982, Klein 1983) und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (Little et al., 1983) festgestellt.

Die c-MYC Expression ist aber auch in einer Vielzahl anderer Tumore, darunter Sarkomen, Melanomen, Karzinomen und Leukämien nachweisbar (Westin et al., 1982, Eva et al., 1982). Sowohl im Burkitt-Lymphom (Croce et al., 1984, Dalla Favera 1982c) als auch in einem Non-Hodgkin-Lymphom (Hayday et al., 1984) wird die Aktivierung des c-MYC-Gens mit einer chromosomalen Translokation in Verbindung gebracht. Wie bereits erwähnt, gelangt hierbei das c-MYC Proto-Onkogen in die Nachbarschaft starker Promotoren, die dann für die starke Expression des Proto-Onkogen verantwortlich sind. Die Stärke der Expression scheint als ein wichtiges Kriterium für die Transformation von Zellen durch das c-MYC Proto-Onkogen zu sein.

Neben dem SIS und MYC Onkogenen ist im Rahmen dieser Arbeit noch das FOS Gen von Interesse. Die v-FOS-Sequenzen des FBJ-murine Osteosarcomavirus (FBJ-MSV) und des FBR MSV Virus wurde mit der Auslösung von Osteosarkomen in neugeborenen Mäusen und mit der Transformation von Fibroblasten in vitro in Zusammenhang gebracht (Finkel et al., 1966, Finkel and Biskis 1968, Curran and Teich 1982, Curran et al., 1982, Levy et al., 1973). Die dem v-FOS Onkogen analoge zelluläre c-FOS Proto-Onkogen Sequenz (Curran et al., 1982) kodiert für ein Transkript von 2,2 kb wobei manchmal zusätzlich eine c-FOS mRNA von 3,5 kb beobachtet wurde (Müller et al., 1983a). Die v-FOS und c-FOS Proteinprodukte findet man genau wie das MYC Proteinprodukt im Zellkern (Curran et al., 1984). Das FOS Zellkernprotein hat eine Größe von 55 kd, wobei sich allerdings das virale und zelluläre FOS

Polypeptid am C terminalen Ende in 48 Aminosäuren unterscheidet (Curran and Teich 1982a), Curran et al., 1982, van Beveren 1983, van Straaten 1983).

Die Expression des c-FOS Proto Onkogens spielt vermutlich bei der Differenzierung von Makrophagen und möglicherweise auch anderer hämatopoetischer Zellen eine Rolle (Müller et al., 1984b, Gonda and Metcalf 1984). In extraembryonalen Geweben wie Chorion, Amnion der Plazenta des Menschen und der Maus wurde mit steigendem Gestationsalter eine zunehmend erhöhte Expression des c-FOS Proto Onkogens nachgewiesen (Adamson et al., 1985, Müller et al., 1982, 1983, 1983b). Möglicherweise hat es auch hier die Funktion zur Differenzierung der extraembryonalen Gewebe oder bestimmter Gewebe des Embryos beizutragen. So beschränkt sich die Expression des c-FOS Gens bei neugeborenen Mäusen auf "Knochen" und "Hautgewebe" (Müller et al., 1982, 1983a). In der Literatur finden sich divergierende Angaben bezüglich der c-FOS Expression bei malignen Neoplasien. Slamon et al., 1984 beschreibt die c-FOS Expression in Tumorbiospien unterschiedlicher histogenetischer Herkunft. Eine andere Untersuchung konnte allerdings bei Kulturzellen embryonaler Karzinome, Leydig Zell Tumore, Neuroblastom, Mammatumore, renaler Adenokarzinome, Fibrosarkom, T-Zell Lymphom, Lungenadenokarzinom keine signifikante c-FOS Expression nachweisen (Müller et al., 1985). Von dieser Arbeitsgruppe wurde daher für die mit Tumorbiospien durchgeführten Expressionsanalysen vermutet, daß die naturgemäß in Tumoren vorhandenen Makrophagen sowie andere Zellen der Hämatopoese für die dort festgestellte c-FOS-Expression verantwortlich waren (Müller et al., 1984a).

Weitgehend gesichert erscheint jedoch z.B. die c-FOS Expression bei sich differenzierenden Zellen einer myeloischen Leukämiezelllinie (Gonda and Metcalf 1984). Wie bereits erwähnt, wurde für die maligne Transformation ein Mehrstufenmechanismus postuliert, an dem verschiedene Onkogene maßgeblich beteiligt zu sein scheinen (Land et al., 1983). Aus diesem Grund wurde bei einigen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kulturzellen neben der c-SIS Expression die Expression der Proto-Onkogene c-MYC und c-FOS untersucht. Für die Proto-Onkogene c-SIS, c-MYC und c-FOS existiert möglicherweise ein Zusammenspiel in einem solchen Mehrstufenmechanismus.

Jüngste Beobachtungen weisen in eine solche Richtung. So führt z.B. die Einwirkung von PDGF auf bestimmte Zellkulturen zu einer verstärkten Transkription oder längeren Halbwertszeit der mRNA sowohl des c-MYC (Kelly et al., 1983) als auch des c-FOS Proto

Onkogens (Greenberg et al., 1984, Chochran et al., 1984), beginnend mit der steil ansteigenden c-FOS-Expression, die jedoch nur kurz (ca.1h) andauert (Krujer et al., 1984). Auf die c-FOS-Expression folgt eine c-MYC Expression, die sich über mehrere Stunden erstreckt, um sich dann auf einem relativ niedrigen Pegel zu stabilisieren. (Müller 1984b). Für das c-MYC Gen finden sich noch weitere Hinweise für eine enge Beziehung zu SIS/PDGF. Normalerweise benötigen gesunde Fibroblasten die beiden Wachstumsfaktoren PDGF und EGF (epidermal growth factor) um sich zu teilen (Stiles et al., 1979). Transfiziert man nun die zelluläre c-MYC- DNA zusammen mit einem starken Promotor in das Genom eines Fibroblasten, so wird dieser unabhängig von der Wachstumssimulation mit PDGF. Um sich zu teilen, benötigt der Fibroblast nur noch die Stimulation durch den Wachstumsfaktor EGF (Armelin et al., 1984).

Solche mit dem c-MYC Gen transfizierte Zellen erfüllen nach Stimulation mit EGF das Malignitätskriterium *in vitro* unter soft Agar in Kolonien zu wachsen (Roberts et al., 1985). In Sarkomkulturzellen findet man die Koexpression der c-MYC und c-SIS Proto-Onkogene, wobei hingegen bei Melanomen, Karzinomen und anderen Tumorkulturzellen zumeist nur das c-MYC Transkript exprimiert wird (Eva et.al., 1982). Ferner ist der vermutlich durch PDGF auto/parakrin stimulierte Cytotrophoblast der menschlichen Plazenta des ersten Trimenons, der neben c-SIS auch c-MYC exprimiert, durch exogen zugeführtes PDGF zu einer weiteren Steigerung der c-MYC Expression stimulierbar (Goustin et al., 1985).

1.4. Experimentelle Grundlage und Zielsetzung

Im Mittelpunkt dieser mit molekularbiologischen Methoden durchgeführten Studie stand die Frage, ob sich im mesenchymalen Tumorkulturzellen eine Expression des c-SIS Proto Onkogens nachweisen läßt, um Hinweise zu erhalten die für die vermutete Beteiligung von SIS / PDGF an malignen Tumorgeschehen sprechen. Untersucht wurde das Auftreten von SIS-mRNA und von SIS-Gen Proteinprodukten in Kulturzellen. Neben diesem Kernpunkt der Arbeit wurde bei einigen exemplarisch untersuchten Kulturzellen noch die Expression der Proto-Onkogene c-MYC und c-FOS studiert, da sich für diese Proto-Onkogene die erwähnte Beziehung zu SIS / PDGF findet.

Da sich in der Literatur die Untersuchung und Beschreibung einer c-SIS Proto-Onkogen Expression nur für eine sehr geringe Anzahl, exemplarisch untersuchter Osteosarkome und anderer Sarkomtypen findet, sollte im Rahmen dieser Arbeit die c-SIS-Onkogen Expression bei einer größeren Anzahl von Tumorkulturzellen durchgeführt werden. Neben den Tumorkulturzellen mesenchymaler Herkunft erschien es interessant, auch gesunde bzw. nicht aus malignen Tumoren isolierte Kulturzellen mesenchymaler Herkunft in ihrer Expression zu analysieren. Da PDGF als Mitogen bei der Narbenbildung, Wundheilung und möglicherweise auch bei embryonalen Prozessen beteiligt ist, wurden u.a. Narbenkeloid-Kulturzellen aufgrund der proliferativen Tendenz des Narbenkeloidgewebes und embryonale Fibroblasten als Vertreter embryonalen mesenchymalen Gewebes auf c-SIS-, c-MYC- und c-FOS-Expression untersucht.

Um Hinweise auf die Synthese des thrombozytären PDGFs zu erhalten, wurde noch eine erythroleukämische Kulturzelle (HEL) die bestimmte megacaryozytäre Eigenschaften (Tabilio et al., 1984) besitzt, in die Studie miteinbezogen.

Bei der SIS-Proteinuntersuchung der Kulturzellen sollten insbesondere nach dem primären c-SIS Translationsprodukt gesucht werden, das im Molekülgrößenbereich (28 kd) des v-SIS Precursor Moleküls p28SIS liegt, da es durch die homologen Nukleotidsequenzen des zellulären und viralen v-SIS-Gens möglich erscheint, daß durch beide Gene ein Precursor Molekül gleicher Länge und Primärstruktur gebildet wird.

Ob die von den Kulturzellen gebildeten SIS Proteinprodukte auch sezerniert werden und somit möglicherweise an einem autokrin/parakrinen Prozeß teilhaben, war die Frage, die zur Untersuchung der Kulturzellmedien einiger SIS Protein positiver Kulturzellen auf sezernierte SIS spezifische Proteine führt.

Bei allen Untersuchungen dienten SSV-transformierte Kulturzellen als positive Kontrolle und somit als Modell einer v-SIS Expression. Menschliche und tierische Fibroblasten des gesunden erwachsenen Organismus sowie eine hepatozelluläre Kulturzelle waren die Kontrolle der negativen SIS- Expression.

Zunächst wurde versucht, mittels eines quantitativen "Screening Verfahrens", dem sogenannten "Dot-Blot", Zellen zu selektionieren die c-SIS-Transkript positiv sind.

Die anschließende Untersuchungen der c-SIS-Genprodukt- Expression wurde mittels Immunpräzipitation durchführt. Um eine qualitative Bestätigung einer positiven c-SIS-Expression zu erhalten, um die mögliche Koexpression der c-MYC und c-FOS Proto-Onkogene mit dem c-SIS-Proto-Onkogen zu untersuchen, sowie um einige widersprüchliche Ergebnisse der c-SIS-Expression bei der RNA Screening Untersuchung und bei der Protein Untersuchung zu verifizieren, wurden zusätzlich bei einigen Kulturzellen exemplarisch RNA-Untersuchungen mittels der "Northern-Blot"-Analyse durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Kulturzellen

Für die Untersuchungen zur Proteinexpression des c-SIS-Gens und die der Expression der Transkripte des c-SIS, c-FOS und c-MYC Gens wurden verschiedene Zelllinien verwendet. Die Bezeichnungen der Kulturzellen mit Literaturangabe entsprechen den Bezeichnungen der American Type Culture Collection (ATCC). Die Bezeichnungen aller anderen Kulturzellen wurden von unserer Arbeitsgruppe gewählt. Als positive Kontrollzellen mit v-SIS Onkogen Expression dienten die SSV-transformierten Kontrollzellen NPI (Non Producer = SSV-infizierte, keine viruspartikel- produzierende Marmoset Fibroblasten Zelllinie, Bergholz et al., 1977) und SSV/SSAV (mit dem SSV und dem SSAV Helfervirus infizierte "marmoset fetal skin cell" (MFS-4) Zellen, welche Viruspartikel produzieren).

Als negative Kontrollzellen dienten die Zelllinie MFS-4 (MFS-4 = marmoset fetal skin cell line 4), MOS MU 20 (Zelllinie gesunder Muskelzellen eines Patienten mit Osteosarkom) und PLC/PRF 5 (Alexander et al., 1978) die als hepatozelluläre Kulturzelle einem Hepatom entstammt. Bis auf PLC/PRF 5 handelt es sich bei den Negativ- und Positivkontrollzellen um Fibroblasten.

Bei den Kulturzellen, die auf ihre Proto-Onkogen-Expression untersucht werden sollten, handelt es sich um TE 85/2, SAOS/2, MOS27, MOS26, MOS25, MOS24, MOS22, MOS20, MOS19, MOS17, MOS 13. (Diese Zelllinien wurden von Dr. v. Erfle, GSF München freundlicherweise zur Verfügung gestellt.)

Diese Kulturzellen entstammen durchwegs Zellisolaten menschlicher Osteosarkome.

TE85/2 und SAOS/2 stammen aus pädiatrischem Krankengut. Bei FIB1, FIB2, FIB3 und HT1080 (Rasheed et al., 1974) handelt es sich um Kulturzellen, welche aus Fibrosarkomen isoliert wurden. Die Kulturzelle RD (McAllister et al., 1969) stellt die Zelllinie eines embryonalen Rhabdomyosarkoms dar.

Neben den Kulturzellen mit tumoröser Herkunft wurden noch drei weitere Zelllinien unterschiedlicher histogenetischer Herkunft untersucht. Es sind dies die folgenden eine Zelllinie mit megakaryozytären Eigenschaften, HEL (Martin and Papayannopoulou 1982), ferner embryonale Fibroblasten, EF, und des weiteren eine aus einem Narbenkeloid isolierte Kulturzelle, KEL. (Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Krieg, Dermatolog, Klinik, LMU München zur Verfügung gestellt.)

2.2. Gewebekulturen

Die Zellkulturen wurden zunächst in Plastikpetrischalen ($d=9,0\text{cm}$, 64 cm^2) der Firma Nunc angelegt. Als Nährmedium diente für RD, HT 1080 und HEL Minimal Essential Medium Eagle (modifiziert) mit Earle's Salzen (Flow Laboratories) mit einem Zusatz von 10%igem fötalem Kälberserum (FKS, Gibco, 30 Min. bei 56 C inaktiviert), 5%igem NaHCO_3 , (nicht bei der HEL-Kulturzelle), sowie 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,5ml/500ml AmphotericinB (Serva). Für alle anderen Gewebekulturen wurde statt MEM Dulbecco's Modification von Eagle's Medium (Flow Laboratories) bei sonst gleichen Vorschriften verwendet. Lediglich die SSV-transformierten Zellen erhielten anstelle des 10%igen fötalen Kälberserums, 10%iges newborn calf serum (NKS, Gibco, 30 Min. bei 56 C inaktiviert) und zusätzlich 2,5ml/500ml DMSO (Merck). Die Zellkulturen auf den Petrischalen wurden in einem Heraeus Brutschrank bei 37 C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 und mehr als 90%iger rel. Luftfeuchte gehalten. Subkulturen wurden angelegt, nachdem die Zellen der vorausgegangenen Passage zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen waren. Die Zellzucht für die "Northern Blot" Untersuchung erfolgte in Zellkulturflaschen (175cm^2 , Nunc). Zum Anlegen der Subkulturen wurden die Zellen einmal mit PBS-Lösung (0,1M phosphat-gepufferte 0,89%ige NaCl-Lösung, pH7,2) gewaschen und anschließend 1 bis 2 Minuten trypsinisiert (0,25%iges Trypsin in PBS-Lösung). Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von Nährmedium gestoppt und die Zellen in einer Menge von 1 bis 3×10^6 Zellen pro Petrischale ($d=9\text{cm}$) neu ausgesät. In gleicher Weise wurden von den Plastikflaschen weitere Subkulturen hergestellt, bis für die Versuche eine ausreichende Menge von Zellen vorhanden war. Die Plastikflaschenkulturen waren nicht im oben beschriebenen Brutschrank, sondern befanden sich verschlossen in einem Wärmeschrank bei 37 C .

Gewebekulturen von HEL, der einzigen Suspensionszelle, mußten nur auf neue Plastikflaschen verteilt und mit neuem Medium versorgt werden. Sie wurden im Brutschrank kultiviert.

2.3. RNA-Untersuchungen

Da die RNA einer ständigen Gefährdung durch den Abbau der überall vorhandenen RNAsen ausgesetzt ist, müssen bei Versuchen, in welchen RNA gehandhabt wird, besondere Vorkehrungen getroffen werden. Hitzebeständige Gegenstände, wie Reagenzgläser wurden 6h bei 180 °C, Plastikmaterial, wie Pipetten 8h bei 130 °C sterilisiert. Hitzeempfindliche Gegenstände (Gummischaber etc.) wurden in sterilem Aqua dest. mit Diäthylpyrocarbonat (5 µl/50 ml, Sigma) aufbewahrt und das Wasser vor Gebrauch kurz aufgeköcht. Alle verwendeten Lösungen hatten ebenfalls einen Zusatz von 5µl Diäthylpyrocarbonat/50 ml und wurden von den Versuchen kurz aufgeköcht. Außerdem wurde bei allen Versuchen Einmalhandschuhe getragen.

2.3.1. RNA "Screening" Untersuchung der Kulturzellen mittels Natriumjodid Methode ("Dot Blot").

2.3.2. "Dot Blot" -Methode (Quick Blot) = Natriumjodid Methode .

Die RNA Screening Untersuchung der Kulturzellen mittels der Natriumjodid Methode wurde mit einem standardisierten kommerziellen Kit (Schleicher & Schüll, Quick Blot) durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der chaotropischen Wirkung von 12,2 M Natriumjodid, durch welche aus dem gesamten Zelllysat selektiv die m RNA an Nitrocellulosefilter gebunden wird. (Bresser et al., 1983).

Die zu untersuchenden Kulturzellen wurden 24h vor Beginn der Untersuchung in einer Menge von 3×10^6 Zellen / Petrischale (d=9cm) ausgesät. Die Zellen wurden 3 x mit PBS

gewaschen, mit einem Gummischaber von der Petrischale gelöst und anschließend in eine Lösung aus PBS, 50 g/ml Cycloheximid und 10mM Vanadyl RNase Inhibitor eingebracht. Das Zellpellet wurde suspendiert und anschließend mit einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem frischen PBS Cycloheximid, Vanadyl-Puffer in einem Verhältnis von 50ul Pellet zu 30ul Puffer erneut aufgenommen. Nach Resuspension wurden 45ul der Suspension entnommen. Es wurden jeweils nach Schütteln 2,5ul der Lösung A und danach 2,5ul der Lösung B des Quickblotkits der Suspension zugegeben. Wiederum nach Schütteln erfolgte der Zusatz von 10ul (2mg / ml) der Lösung von Pronase K in Wasser. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 C erfolgte der Zusatz von 60ul der vorher auf 80 C erhitzten Lösung C des Quickblotkits. Nach Schütteln wurden noch 80ul der Lösung D des Quickblotkits zugegeben.

Aus dem Ansatz wurden nun 50, 25, 12, 6 ul entnommen, auf Eppendorf-Gefäße verteilt und durch Auffüllen auf jeweils 50ul mit Lösung E des Quickblotkits Verdünnungen von 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 7 hergestellt. Die jeweils 50ul der einzelnen Verdünnungen wurden bei Zimmertemperatur durch einen Mikrofoldfilter (Schleicher & Schüll) filtriert. Die mRNA der einzelnen Verdünnungen wurde damit an einen bestimmten Fleck des Nitrocellulosefilters gebunden.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte bei 0 C auf Eis durchgeführt.

Die verschiedenen Lösungen des Quickblotkits entsprechen:

Lösung A =Brij35 , Lösung B =Natriumdesoxycholat DOC , Lösung C,D,E =NaJ-
Lösungen unterschiedlicher Konzentration

Der Nitrocellulosefilter wurde luftgetrocknet und anschließend wie bei der "Northern Blot"-Analyse beschrieben der Hybridisierung zugeführt.

2.3.2.1. RNA Untersuchung der Kulturzellen mittels

"Northern Blot" -Analyse.

2.3.2.2. RNA- Extraktion

Für die Gewinnung der RNA wurden bei den Zellkulturen 8 bis 10 Zellkulturflaschen mit dichtem Zellrasen (etwa $24 - 30 \times 10^7$ Zellen) verwendet.

Der Zellbelag wurde zunächst einmal mit PBS gewaschen. Von da an wurden die Kulturflaschen auf Eiswasser gelagert. Mit etwas PBS wurden die Zellen dann mit dem Gummischaber von der Unterlage gelöst und in Reagenzgläsern gesammelt. Nach zweiminütigem Zentrifugieren bei 1500U/min und Dekantieren des Überstandes blieb das Zellpellet zurück. Die auf diese Art gewonnenen Zellen wurden entsprechend der leicht abgewandelten Methode von Auffray und Rougeon (1980), in 6M Harnstoff, 3M LiCl resuspendiert (10ml/g Zellmaterial) und diese Suspension noch einmal mit flüssigem Stickstoff stark heruntergekühlt. Darauf wurden die Zellen mit einem Mixer (Ultra-Turrax, Janke und Kunkel) zerstört und die aufgebrochenen Zellen über Nacht bei -5 C aufbewahrt. Es folgte 30 Min. Zentrifugieren bei 14000g und Dekantieren des Überstandes. Das Pellet wurde aufgelöst in 2ml 10mM TEA, 0,5% SDS, 1mM EDTA, pH7,6 und dann 1ml Phenol und 1ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Beide Phasen wurden auf dem Vortex-Genie (Scientific Ind.) sehr gut und oft durchmischt. Nach 5 Min. Zentrifugieren bei 3000U/min und Entfernen der Phenolphase wurde das gleiche noch einmal mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol, dann ausschließlicly mit 2ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Von der am Schluß gewonnenen wässrigen RNA-Phase wurde ein Bruchteil für die photometrische Konzentrationsbestimmung entnommen, dem Rest wurde eine Spatelspitze Natriumacetat zugegeben und dann mit 2,5 Volumen absoluten Alkohols die RNA über Nacht bei -20 C ausgefällt.

Die RNA-Konzentration wurde mit dem Spectrophotometer UV120-02 (Shimadzu) gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260nm entspricht 1 O.D. (Optische Dichte) einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

2.3.2.3. Oligo(dT)-Cellulose Chromatographie

Zur Anreicherung der mRNA wurde Oligo(dT)-Cellulose Typ 7 von P-L Biochemicals verwendet. Die Oligo(dT)-Cellulose wurde in eine Säule gefüllt, der ein Photometer nachgeschaltet war. Ein damit verbundener Schreiber zeigte kontinuierlich die RNA-Konzentration an. Die Apparatur wurde zunächst durch 0,1M NaOH, 5mM EDTA sterilisiert. Als Kontrolle diente der Schreiber, der nach der Sterilisierung keinen Ausschlag anzeigen durfte. Durch Zugabe von High Salt (20mM TEA, 0,1% SDS, 1mM EDTA, 0,5M NaCl) wurde die Säule auf pH7,5 eingestellt.

Die alkoholgefällte RNA wurde 30 Min. bei 14000g zentrifugiert und das Pellet in 1ml High Salt aufgenommen. Nach 5 Min. Erhitzen bei 65 C und Abkühlen auf Raumtemperatur lief die RNA-Lösung viermal über die Oligo(dT)-Säule. Mit High Salt wurde dann solange nachgewaschen, bis der Schreiber anzeigte, daß sich keine ribosomale RNA mehr in der Säule befand.

Zum Auswaschen der nun an der Cellulose haftenden mRNA wurde Low Salt (10mM TEA, 1mM EDTA, 0,05% SDS) verwendet. Etwa 10 ml des auf 65 C erhitzten Low Salt bewirkte eine weitgehende Entfernung der mRNA aus der Säule. Von der gewonnenen mRNA-Anreicherung wurde ein Bruchteil für die photometrische Mengenbestimmung entnommen. Der Rest wurde mit einer Spatelspitze Natriumacetat und Alkohol gefällt und bei -20 C aufbewahrt.

2.3.2.4. Formaldehyd-Agarosegele

Es wurden 1,1% Agarosegele verwendet. Die Agarose (Seakem, LE von FMC) wurde in 1x MOPS-Puffer (20mM 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure (MOPS, Hoechst), 5mM Natriumacetat, 1mM EDTA) aufgeköcht, auf 60 C abgekühlt und mit 1/6 Volumen Formaldehyd (=2,2M, 37%ig, stabilisiert mit 10% Methanol, Merck) vermischt. 10 - 30 µg der RNA-Proben wurden als trockenes Äthanolpräzipitat im Probenpuffer (30ul/25ug RNA, 1xMOPS, 50% Formamid, 2,2M Formaldehyd, 1% Ficoll, 0,02 % Bromphenolblau) aufgenommen und 25 Min. bei 65 C denaturiert. Als Marker wurde 16S und 23S ribosomale RNA auf Escherichia coli MRE 600 (Boehringer) verwendet. 2ul der RNA Marker-Lösung wurden genau wie die RNA-Proben im Probenpuffer aufgenommen und ebenfalls 25 Min.

bei 65 C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1xMOPS-Puffer mit 50 - 90 V für 5 - 6h. Die Elektrophorese wurde in einem Elektrophoresekasten durchgeführt, in welchen vorher das Formaldehyd-Agarosegel gegossen wurde.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf eine Kieselgelplatte gelegt. Mit einer Ultraviolett-Oberlampe wurde beides beleuchtet. Durch die Absorption der ultravioletten Strahlung durch die Nukleinsäuren konnten die Markerbanden als Lücken in der Fluoreszenz der Kieselgelplatte beurteilt werden.

2.3.2.5. "Northern Blot"

Es folgte der "Northern Blot", der ähnlich dem zuerst entwickelten Southern Blot abläuft (Southern, 1975). Dazu wurde das RNA-Gel nach der Elektrophorese ohne weitere Zwischenschritte auf 2 große Bogen Whatman 3MM-Papier gelegt, die seitlich von einer Glasplatte herunter in 20xSSC-Puffer (3M NaCl, 0,3M Trinatriumtricitrat) tauchten. Auf das Gel wurde luftblasenfrei ein in 2xSSC (300mM NaCl, 30mM Trinatriumtricitrat) äquilibrierter Nitrocellulosefilter (BA85, Porengröße 0,45µm, Schleicher & Schüll) gleicher Größe gelegt und auf allen vier Seiten mit ca. 5cm breiten Streifen Plastikfolie versehen, so daß die Ränder der Nitrocellulose ca. 2mm breit bedeckt waren. Darauf wurden 6 in 10xSSC getränkte Blatt 3MM-Papier gelegt, dann folgte ein ca. 15cm hoher Stapel aus Toilettpapierrollen und Papierhandtüchern. Die ersten 30 Min. war der Aufbau nur mit einer Glasplatte, dann zusätzlich mit einem 1/2kg schweren Gewicht beschwert. Nach Ende des Blots wurde der Nitrocellulosefilter 5 Min. in 6xSSC gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und zur endgültigen Fixierung der RNA 2h bei 80 C gebacken.

2.3.2.6. Hybridisierung

2.3.2.6.1. Verwendete Proben und deren Isolation

Für die SIS-Hybridisierung wurde das rekombinierte Plasmid pSM-1 verwendet, das von Clarke et al., 1984 hergestellt wurde. Es besteht aus dem Vektor pcD und einem 2,7kb langen Abschnitt des c-SIS-Gens, das die ersten drei Exons enthält. Durch die Spaltung mit den Restriktionsenzymen BSTE2 und PVU2 entstand die verwendete Probe von 5,5kb, die den

vollständigen c-SIS-Genabschnitt und einen Teil des Vektors enthielt.

Die FOS-Hybridisierung wurde mit dem Plasmid p-c-FOS(h) durchgeführt, das auf die Arbeit von Curran et al., 1983 zurückgeht. Als Vektor dient pBR322. Die Insertion ist 6kb lang. Sie besteht aus dem kompletten c-FOS-Gen und angrenzenden DNA-Abschnitten und geht auf die Spaltung mit BamHI zurück. Die Restriktionsenzyme Xho I und Nco I spalten aus diesem DNA-Abschnitt ein Stück von etwa 3kb, das für die FOS-Hybridisierung verwendet wurde.

Die MYC-Hybridisierung wurde mit einer 1,0kb langen c-DNA-Probe durchgeführt, die durch Spaltung mit PstI und BclI entstanden war. Sie enthielt das zweite Exon und einen Teil des dritten Exons (Croce et al., 1984).

Die Actin-Hybridisierung wurde mit einer 1,9kb langen c-DNA-Probe durchgeführt, die durch Spaltung mit PstI entstanden war und die Nukleotidsequenzen von human Actin enthielt. Als Vektor diente pBR322.

Die rekombinierten Plasmide wurden in Bakterien transfektiert (siehe Maniatis et al., 1982) und dort vermehrt. Das Pellet von 500ml Bakterienkultur wurde in 10ml 50mM Glucose, 25mM Tris-Cl (pH 8,0) und 10mM EDTA aufgenommen und 5 Min. stehen gelassen. Danach wurden 20ml 0,2N NaOH, 1% SDS zugegeben und das Ganze 10 Min. auf Eis gestellt. Dann wurden 15ml einer kalten 5M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) zugeführt und wiederum 10 Min. auf Eis gestellt. Bei 40 C wurde die Lösung dann bei 20000 U/min 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde gut mit gleichen Volumen von Phenol/Chloroform durchmischt. Nach 5 Min. Zentrifugieren bei 3000 U/min wurde die obere Phase abgehoben, mit gleichen Volumen Chloroform vermischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und bei Raumtemperatur 15 Min. stehen gelassen. Durch 30minütiges Zentrifugieren bei 12000 g wurde ein Pellet gewonnen, daß mit 70% Äthanol gewaschen und dann getrocknet wurde. Das Pellet wurde in 8ml TE (pH 8,0) aufgenommen (Maniatis et al., 1982). Aliquots von 500ul wurden dann nach den oben erwähnten Vorschriften mit Restriktionsenzymen gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt. Die relevanten Banden wurden ausgeschnitten und in einem Dialyseschlauch in Gegenwart von 300 bis 500ul eines Tris-Borat-Puffers (90mM Tris, 90mM Borsäure, 2mM EDTA, pH

7,6) ein bis zwei Stunden in einer Gelkammer unter Standardbedingungen elektrophoretisiert.

Der plasmidhaltige Puffer wurde anschließend entnommen und mit der Elutipsäule (Schleicher & Schüll) gereinigt. Dem Puffer wurden ca. 5ml 10mM Tris-Cl (pH 7,6), 5mM EDTA, 0,2 M NaCl zugesetzt und diese Lösung durch die Säule gedrückt. Nach Waschen der Säule mit 5ml des gleichen Puffers wurde die DNA mit 0,4ml 10mM Tris-Cl (pH 7,6), 5mM EDTA, 1,0 MNaCl eluiert und mit dem 2,5fachen Volumen Äthanol gefällt.

2.3.2.6.2. " Nick-Translation"

Die Nick-Translation wurde entsprechend der Methode laut Maniatis et al., 1982 durchgeführt. Der Reaktionsansatz lautet:

2,5ul	10xNick-Translationspuffer (0,5M Tris-HCL, pH 7,2, 0,1M MgSO ₄ , 1mM Dithiothreitol, 500ug/ml Bovines Serum-Albumin)
je 0,5ul	einer mM-Lösung von ATP, GTP und TTP
0,5ul	des Gens (1mg/ml, insges. 0,5ug)
4ul	H ₂ O
0,5ul	DNA-Polymerase (1ul= 5 units, Boehringer)
1ul	DNase I (250ng/ml, Worthington)
15ul	32 P-alpha-dCTP (3000-Ci/mmol, 10mCi/ml, insges. 150u Ci, Amersham)

Die Reaktion lief 90 Min. bei 15 C. 1ul des Reaktionsansatzes wurden für die TCA-Fällung zur Bestimmung der eingebauten und spezifischen Radioaktivität verwendet. Bei den restlichen 24ul wurde die Reaktion durch 200ul 2mM EDTA abgestoppt. 250ul Phenol wurden zugegeben, beide Phasen durchmischt, nach 2 Min. Zentrifugieren bei 12000g die Phenolphase abpipettiert und der gleiche Vorgang noch einmal mit Chloroform wiederholt. Die radioaktive DNA in der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von Natriumacetat und 2,5 Volumen 100%igen Alkohol über Nacht bei -20 C ausgefällt. Als trockenes Pellet nach Zentrifugation (12000g, 15 Min.) konnte es nach Lösen in H₂O dest. zur Hybridisierung

verwendet werden.

Für den Reaktionsansatz wurden in 5ml 10%iger TCA (Trichloressigsäure), versetzt mit 100ul Fisch-DNA (1mg/ml), eingebracht. Nach kurzer Inkubation wurde es durch ein breites einmal mit 10%iger TCA vorgewaschenes Filterblättchen gesaugt und dieses noch je dreimal mit 10%iger TCA, dann mit 70%igem Äthanol nachgewaschen. Der trockene Filter wurde in ein kleines Plastikröhrchen mit Aquasol-2 (New England Nuclear) gebracht und die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler (MR 300, Kontron) bestimmt. Die spezifische Radioaktivität betrug meist etwa 4×10^8 cpm/ug DNA. Insgesamt standen also etwa 2×10^8 cpm zur Verfügung.

2.3.2.6.3. Hybridisierung der RNA Nitrocellulosefilter

Die Filter wurden zunächst 5 Min. in 20xSSC gewaschen. Das Vorhybridisieren bei 42 C dauerte 8 - 20h. Die Lösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

50 % Formamid, 5xSSC, 50mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6,5,

0,02% BSA, 0,02% Ficoll, 0,02% PVP + 250ug denaturierte E.coli-DNA/ml Vorhybridisierungslösung.

Für die 48stündige Hybridisierung wurde die gleiche Lösung verwendet. Pro Filter wurden etwa 7×10^6 cpm der denaturierten Probe zugesetzt. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Filter 4x5 Min. bei Raumtemperatur mit 2xSSC, 0,1% SDS, dann 2x15 Min. bei 50 C mit 0,1xSSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Filter exponierten 5 - 20 Tage auf Kodak X-Omat S Röntgenfilmen.

Für die erneute Verwendung wurden die Filter eine Stunde bei 80 C in 0,1xSSC, 0,1% SDS dehybridisiert. Das Vorgehen bei der Hybridisierung war für die Nitrocellulosefilter des NatriumjodidMethodes und die des "Northern Blots" gleich.

Eine Dehybridisierung der Filter der "Dot Blot"-Analyse konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da diese Filter nicht gebacken wurden.

2.4. Proteine

2.4.1. Markierung der Zellproteine mit ^{35}S -Methionin

Die Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn der Markierung in einer Menge von 3×10^6 Zellen pro Petrischale ($d=9\text{cm}$) ausgesät. Die Kulturen befanden sich während der Markierung in der Wachstumsphase, sodaß ein optimaler Einbau der Radioaktivität gewährleistet war.

Die Zellen wurden dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und eine Stunde mit 3ml Earle's physiologischer Salzlösung und 0,3ml hitzeinaktiviertem, gegen PBS dialysiertem fötalem Kälberserum bei 37 C vorinkubiert.

Anschließend wurden 150uCi/ml ^{35}S -Methionin zugesetzt. (spezifische Aktivität: 1100-1400 Ci/mmol in 20mM Kaliumacetat, 0,1% 2-Mercaptoäthanol, Amersham).

Die Zellen wurden 12 Stunden bei 37 C inkubiert, anschließend wurde das überstehende Zellkulturmedium verworfen und die Zellen dreimal mit FBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend der Immunpräzipitation zugeführt.

2.4.2. Isolierung und Analyse von Proteinen durch Immunpräzipitation

2.4.2.1. Antiseren

Bei den verwendeten Antiseren handelt es sich um Kaninchen-Immunsereen. Die bei den Kaninchen zur Erzeugung einer Immunantwort mit Antikörperbildung verwendeten Antigene waren synthetische Peptide von ca. 10 Aminosäuren, welche in ihrer Sequenz Teilen der SIS/PDGF-B-Kette entsprachen.

So entspricht das dem Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS) zugrundeliegende antigene Peptid Teilen des C-terminalen Ende der SIS/PDGF-B-Kette (Aminosäure 217-226), das des Kaninchenantiserum (anti-intern/SIS) dem Mittelteil der SIS/PDGF-B-Kette (Aminosäure 98-107).

Als Kontrolle diente jeweils normales Kaninchenserum. Die eingesetzten Mengen Serum lagen jeweils bei 10ul für das Serum (anti-C-term./SIS), bei 15ul für das Serum (anti-intern/SIS) und gleichfalls bei 15ul für das Kaninchenkontrollserum.

2.4.2.2. Immunpräzipitation zellgebundener SIS-spezifischer Proteine

Radioaktiv markierte Zellen (vgl. 2.4.1.) wurden dreimal mit PBS gewaschen und in 1ml Lysispuffer (0,01 M Tris-HCL, pH 7,6, 0,05 M NaCl, 0,5% DOC (Natriumdesoxycholat, Merck), 2mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 0,1% SDS) bei 0 C lysiert. Anschließend wurden in einer Eppendorf Tischzentrifuge 2 Min. lang gröbere, nicht lysierte Komponenten abzentrifugiert und der Überstand 30 Min. in einer luftgetriebenen Ultrazentrifuge (Beckman, Airfuge) bei 35000 x g zentrifugiert. Das Pellet der Ultrazentrifugation wurde verworfen, der Überstand wurde mit 25ul des Kaninchenkontrollserums und 150ul einer 15%igen Suspension von Sepharose-gebundenem Staphylococcus aureus Protein A (Pharmacia) 2 Stunden bei 40 C unter Schütteln präabsorbiert. Anschließend wurde 2 Min. mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand erneut mit 50ul des Sepharose-gebundenen Staphylococcus aureus Protein A versetzt.

Nach 40minütigem Schütteln bei 40 C wurde erneut 2 Min. auf der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in Aliquots zu 0,3ml aufgeteilt. In die aufgeteilten Aliquots wurden nun jeweils die angegebenen Mengen des Antiserums oder des Kontrollserums zugegeben. Gleichfalls zugegeben wurden 20 - 60ul der Protein A Sepharose.

Die Fällungsansätze standen 10 Min. bei 37 C und wurden anschließend ca. 12 Stunden bei 40 C geschüttelt. Die entstandenen Immunkomplexe wurden durch 2minütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge gewonnen.

Dann wurden die Präzipitate zweimal mit je 1ml einer Lösung von 0,5% Triton X-100, 0,5% DOC in 0,05 M NaCl, 0,01M Tris-HCL, pH 7,6 und anschließend dreimal mit je 1ml 0,05 M NaCl, 0,01 M Tris-HCL, pH 7,6 gewaschen und in der Tischzentrifuge pelletiert.

Die gewaschenen Immunkomplexe wurden nach Elution im Auftragspuffer durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (vgl. 2.4.4.1.).

2.4.2.3. Immunpräzipitation sezernierter SIS-spezifischer Proteine der Medienüberstände der Kulturzellen

Die Medienüberstände der Kulturzellen mit den sezernierten ³⁵S-Methionin markierten Proteinen (siehe 2.4.1.), wurden gewonnen. Die Überstände wurden 5 Min. bei 5000 U/min. abzentrifugiert, das Pellet mit den größeren nicht gelösten Bestandteilen wie Zellen und Zellresten verworfen. Der Überstand wurde anschließend unter Rühren im Verhältnis 1 : 1 mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung (Merck) versetzt und die Proteine 20 Min. bei 0 C gefällt.

Der Ansatz wurde zweimal unter jeweiligem Verwerfen des Überstandes bei 15000 x g bei 40 C in der Sorvall-Kühlzentrifuge zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 1ml Lysispuffer (vgl. 2.4.3.3.) aufgenommen und anschließend mit 10ul des Kaninchenkontrollserums und 90ul der Protein A Sepharose (vgl.2.4.3.3.) versetzt. Nach 40minütigem Schütteln bei 40 C wurde 2 Min. mit der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet verworfen, der Überstand erneut mit 50 ul der Protein A Sepharose versetzt und 20 Min. bei 40 C geschüttelt.

Anschließend wurde der Ansatz 2 Min. auf der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert, das Pellet verworfen, der Überstand in zwei Aliquots von ca. 0,5ml aufgeteilt und jeweils mit 50 ul der Protein A Sepharose und 15 ul des Kaninchenantiseraums (anti-intern/SIS) bzw. 15 ul des Kaninchenkontrollserums versetzt. Anschließend wurde 12 Stunden bei 40 C geschüttelt.

Die entstandenen Immunkomplexe wurden durch zweiminütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge gewonnen, und anschließend wie in 2.4.3.2. beschrieben gewaschen. Die gewaschenen Immunkomplexe wurden nach Elution im Auftragspuffer durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (vgl. 2.4.4.1.).

2.4.3. Elektrophoretische Aufarbeitung

2.4.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid -Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Es kamen 12,5 und 15%ige Acrylamidgele mit einem Anteil von 0,3 bzw. 0,35% Bisacrylamid zur Anwendung.

Als Elektrophorese-Kammer diente ein System aus 2 übereinander angeordneten Elektroden-Kammern, die durch ein zwischen Glasplatten gegossenes und vertikal eingespanntes Gel während der Elektrophorese verbunden waren. Aus folgenden Puffern und Stammlösungen wurden entsprechend Tabelle die jeweiligen Gel-Lösungen gemischt:

Acrylamidlösung	: 30% Acrylamid (Serva) 0,7% Bisacrylamid (Serva)
Tris-Puffer I (Trenngel)	: 0,75 M Tris-HCl, pH 8,8 0,2% SDS
Tris-Puffer II (Sammelgel)	: 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8 0,2% SDS

Tetramethyläthylendiamin (TMED, Serva)
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS, Serva)

Als Elektrodenpuffer diente eine Lösung von 0,1% SDS und 0,192 M Glycin (Serva) in 0,025 M Tris-HCl, pH 8,2.

Die Proben wurden mit einem Teil vierfach konzentriertem Auftragspuffer (7% SDS, 30% Glycerin, 20% 2-Mercaptoäthanol in 0,09 M Tris-HCl, pH 6,8) auf 4 Teile der Probe und einen Teil H₂O versetzt. Anschließend wurden die Proben 5 Min. gekocht und 2 Min. in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde in die Auftragspalten eingefüllt und mit Elektrodenpuffer überschichtet.

Die 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgele dienten der Auftrennung der zellgebundenen Proteine,

die 15%igen Gele die der Auftrennung der sezernierten Proteine.

Referenzproben

Als Marker für die Wanderungsgeschwindigkeit wurden verschiedenen Proteinmischungen parallel zu den Proben auf das Gel aufgetragen. Es handelte sich dabei um Phosphorylase b (MW = 94000 d), Rinderserumalbumin (66000 d), Ovalbumin (45000 d) und Cytochrom c (124000 d). Außerdem wurde eine Suspension der Strukturproteine p27, p19, p15 und p12 Hühner-Myeloblastose-Virus (AMV) als Marker verwendet.

Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Die Gele wurden zunächst 5 Minuten in 50% TCA fixiert und anschließend 10 Min. in Färbelösung (0,4% Coomassie-Blau R 250 (Serva) in 50% TCA) geschüttelt. Dann wurde 18 Stunden in 20% Methanol (Merck), 7% Essigsäure (Merck) unter Schütteln entfärbt.

Autoradiographie

Für die Autoradiographie wurden die Gele nach abgeschlossenem Färbevorgang bei 80 °C unter Vakuum getrocknet und einem Kodak NS-2T Röntgenfilm aufgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur Expression der Produkte des c-SIS-Gens und der Transkripte des c-MYC und c-FOS-Gens in den verwendeten Kulturzellen .

3.1.1. Auswahl der verwendeten Kulturzellen

Die Grundlage der Studie bilden die 24 im Materialteil (2.1.) charakterisierten Kulturzellen, deren Vertreter bis auf die Kulturzelle HEL und die Negativkontrollzelle PLC/PRF 5 mesenchymaler Herkunft sind. Neben 16 Osteo- ,Rhabdomyo- und Fibrosarkomkulturzellen wurden auch 4 nicht transformierte mesenchymale Kulturzellen, 1 hepatozelluläre Kulturzelle, 1 megacaryocytaire Kulturzelle, sowie 2 der Kontrolle der SIS Expression dienende Kulturzellen untersucht.

Im Einzelnen wurden untersucht:

(Zu speziellen Angaben der Kulturzellen siehe 2.1.)

MOS 27 ,MOS 26, MOS 25, MOS 24

MOS 22 ,MOS 20, MOS 19 ,MOS 17 = Kulturzellen die sich aus
MOS 13 ,TE 85/2 ,SAOS 2 11 Osteosarkomen entwick-

elten, darunter 2 aus
pädiatrischen Krankengut
stammende (TE 85/2,SAOS 2)

FIB 1 , FIB 2 , FIB 3,
HT 1080

= Kulturzellen aus Zell-
isolaten von 4 Fibro-
sarkomen

RD		= Rhabdomyosarkomzelllinie
KEL		= Aus Narbenkeloidgewebe isolierte Fibroblasten
EF		= Aus embryonalem Gewebe isolierte Fibroblasten
HEL		= Aus einer Erythroleukämie isolierte Kulturzelle mit megacaryocytären Eigenschaften
NP 1 und SSV/SSAV	= Kontrolle für pos.v-SIS Expr.	= SSV infizierte und transformierte Fibro- blasten .
MFS 4	=Kontrolle für neg. c-SIS Expr.	= nicht transformierte Marmosetfibroblasten
MOSMU 20		= aus gesundem menschl. Muskelgewebe isolierte Kulturzellen
PLC/PRF 5		= Hepatozelluläre Kulturzellen

3.1.2. Methodischer Ablauf der Untersuchungen

Eine Übersicht über die Kulturzellen und die bei ihnen durchgeführten Untersuchungen liefert die Tabelle 1.

Zu Beginn stand die Analyse der c-SIS Transkription bzw. die Suche nach c-SIS m-RNA in den Kulturzellen. Bei der m-RNA Analyse wurde die Gesamte m-RNA des Zelllysats

TABELLE 1

KULTURZELLEN	PROTEINUNTERSUCHUNG		RNA-UNTERSUCHUNG	
	INTRAZELLULÄR	SEZERNIERT	"DOT BLOT"	"NORTHERN BLOT"
SSV/SSAV KONTROLLE FÜR SSV INFIZIERTE NP 1 = POS.SIS EXPR. = FIBROBLASTEN	D	-	D	D
FLC/FRF 5 KONTROLLE FÜR = HEPATOZELLULÄR	D	D	D	D
MOS MJ 20 = FIBROBLAST	D	-	-	-
MFS 4 = NEG.SIS EXPR. = FIBROBLAST	D	-	D	-
EF = EMBRYONALER FIBROBLAST	D	-	D	D
KEL = NARBEKELOID KULTURZELLE	D	D	D	D
HEL = MEGACARYOZYTÄRE KULTURZELLE	D	D	D	D
HT 1080	-	-	D	D
FIB 1	-	-	D	-
FIB 2	-	-	D	-
FIB 3	D	-	D	-
RO = RHABDOMYOSARKOM KULTURZELLE	D	-	D	D
TE 85-2	D	D	D	-
SAOS 2	D	D	D	-
MOS 27	-	-	D	-
MOS 26	D	D	D	D
MOS 25	D	-	D	-
MOS 24 = OSTEOSARKOM KULTURZELLEN	D	-	D	D
MOS 22	-	-	D	-
MOS 20	D	-	D	-
MOS 19	D	-	-	-
MOS 17	D	-	D	-
MOS 13	D	-	D	D

D = UNTERSUCHUNG DURCHGEFÜHRT - = UNTERSUCHUNG NICHT DURCHGEFÜHRT

untersucht. Analysen der Halbwertszeiten der m-RNA's während der m-RNA Reifung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der Aufwendigkeit der dazu notwendigen Experimente nicht durchgeführt. Als Suchreaktion (Screening) nach c-SIS mRNA kam die in (2.3.1.2.) beschriebene Natriumjodid-Methode ("Dot Blot") zur Anwendung, welche eine quantitative Erfassung der zellulären mRNA ermöglicht.

Die Natriumjodid-Methode wurde aufgrund zweier Vorzüge als "Screening" Methode bei der Untersuchung auf das c-SIS Transkript eingesetzt. Zum einen erlaubt sie ein relativ schnelles Aufarbeiten des Versuchsmaterials, zum anderen ist die gleichzeitige Aufarbeitung mehrerer Proben möglich. Ein Nachteil der Methode ist, daß sie zwar eine quantitative Erfassung der mRNA erlaubt, jedoch keine qualitative Aussage über die Molekulargröße der Poly A(+)RNA zuläßt. Die Methode arbeitet nach der von (Bresser et al., 1983 a,b) beschriebenen Beobachtung.

Kurz: Durch die chaotropischen Eigenschaften von 12,2 M Natriumjodid werden bei der Lösung von zellulären Bestandteilen in selbiger die Nukleinsäuren von den mit ihnen assoziierten Proteinen getrennt. So bindet, bei Raumtemperatur, selektiv die Poly A(+)RNA (mRNA) der in die Natriumjodid-Lösung eingebrachten Zellen direkt an Nitrocellulose, wohingegen die Denaturierte Poly A(-)RNA (rRNA, tRNA) sowie Proteine und die DNA der Zellen nicht bzw. kaum an Nitrocellulose binden. Bei der verwendeten Natriumjodid-Methode (Quick Blot, Schleicher & Schüll) sollen <1% DNA und <0,1% Proteine an die Nitrocellulose gebunden werden. Der Mechanismus der Bindung von mRNA an Nitrocellulose ist unbekannt. Mittels dieser Methode wurden 22 Zelllinien untersucht (siehe Tabelle 1 und 2).

Nicht untersucht werden konnten die Negativkontrollzelle PLC/PRF 5 und die Osteosarkomkulturzelle MOS 19. In Abhängigkeit von den Ergebnissen des "Dot Blot's" wurde bei mehreren Kulturzellen die Proteinuntersuchung durchgeführt.

Zum Nachweis spezifischer c-SIS-Genprodukte, also der SIS Proteine diente die in (2.4.) beschriebene Immunpräzipitation mit Analyse der Proteine auf SDS Polyacrylamidgelen.

Von 13 im "Dot Blot" positiven Zellen der 22 untersuchten, Kulturzellen wurden alle bis auf die Kulturzellen FIB II und HT 1080 auf intrazelluläre SIS-Proteine untersucht. Von den negativen bzw. fraglich positiven kamen die Kulturzellen EF, MOS Mu 20, MOS 17, KEL und FIB III; von den nicht mit der Natriumjodid-Methode Erfassten kamen noch die PLC/PRF 5 und MOS 19 Kulturzellen zur Protein-Untersuchung. (vgl. Tabelle 1 und 4)

Um auch die Proteine zu erfassen, die gegebenenfalls von den Zellen sezerniert werden, wurden bei 6 Kulturzellen die SIS-spezifische intrazelluläre Proteine zeigen, die Zellkulturmedien mittels Immunpräzipitation auf c-SIS-Produkte untersucht. Die Zellkulturmedien stammten von den exemplarisch nach Gewebsursprung und Eigenschaften ausgewählten KEL, HEL, MOS 26, TE 85/2, SAOS/2 und NP 1 Kulturzellen.(vgl. Tabelle 1 und 5)

Die anschließende "Northern Blot" m-RNA Untersuchung bei einigen exemplarisch ausgesuchten Kulturzellen wurde durchgeführt, um zum einen eine bestätigende Aussage über die Molekülgröße des c-SIS Transkripts machen zu können, und um zum anderen auch die Transkripte der Proto-Onkogene c-MYC und c-FOS zu erfassen. Zudem erschien eine weitere m-RNA Untersuchung notwendig, da die Ergebnisse der RNA Expression im "Dot Blot" und die der Proteinexpression bei einigen Kulturzellen z.t. nicht übereinstimmte (vgl. Tabelle 6). Die "Northern Blot"-Analyse sollte einen genaueren Aufschluß über die m-RNA Expression bei diesen Zellen liefern.

Die "Northern Blot"-Analyse hat den Vorteil, daß sie nicht nur eine Aussage über die Menge der transkribierten RNA zuläßt, sondern daß man zusätzlich qualitativ die Größe der gefundenen mRNA beurteilen kann. Sie ermöglicht somit eine spezifischere Aussage über die mRNA als die Natriumjodid-Methode, bei welcher unter Umständen eine unspezifische Bindung der Probe auftreten kann. Des weiteren ist bei der "Northern Blot"-Analyse nicht nur die SIS mRNA bestimmbar, sondern auch andere mRNAs sind erfaßbar, da bei diesem Verfahren eine Trennung der Transkripte nach Molekülgröße erfolgt und durch bestimmte Vorzüge der Methode eine wiederholte Untersuchung der an Nitrocellulose gebundenen Transkripte möglich ist. Die Zellen, die mittels "Northern Blot"-Analyse auf c-SIS, c-MYC und c-FOS Expression untersucht wurden, waren: NP 1, SSV/SSAV, EF, RD, MOS 26, MOS 24, MOS 13, HEL, KEL, HT 1080.

Eine Übersicht über die Ergebnisse liefert die Tabelle 6. Die vollständige Untersuchung aller Zellkulturen mit den oben erwähnten Methoden war mangels Material und z.t. auf Grund spezifischer Wachstumseigenschaften mancher Kulturzellen nicht durchführbar, so daß sich die Auswahl der vollständig untersuchten Zellkulturen auf exemplarisch gewählte Kulturzellen beschränkte. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse ist daher nicht möglich. Der Übersichtlichkeit halber werden die Ergebnisse der m-RNA Untersuchungen ("Dot Blot" , "Northern Blot"-Analyse) zusammen vor denen der Proteinuntersuchung gezeigt, obwohl diese chronologisch vor der "Northern Blot"-Analyse durchgeführt wurde.

3.2. Nachweis von c-SIS mRNA in den Kulturzellen mittels Natriumjodid-Methode ("Dot Blot")

Im folgenden sollte mit dieser Methode untersucht werden, ob sich spezifische c-SIS-mRNA in 22 Kulturzellen (vgl. 2.1., 3.1.2. und Tabelle) nachweisen läßt. Die Zellen wurden in Kultur auf Petrischalen zu einer gleichmäßigen Dichte von 1×10^7 Zellen pro Petrischale gezüchtet und nach der in (2.3.1.1.) beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die Zellextrakte wurden in absteigenden Verdünnungen auf einen Nitrocellulosefilter aufgebracht. Die Hybridisierung der an die Nitrocellulose gebundenen mRNA mit einer 32 Phosphor (P^{32}) markierten c-SIS-DNA Probe zeigte nach Autoradiographie die in Abb. 3 dargestellten Ergebnisse. Eine Übersicht über die Ergebnisse findet sich in Tabelle 2.

TABELLE 2

M-RNA (NAJ-METHODE)

KULTURZELLE	SIS	KULTURZELLE	SIS
SSV/SSAV	+	RD	+
NP 1	+	TE 85-2	+
MOS MU 20	-	SAOS 2	+
MFS 4	-	MOS 27	(+)
EF	-	MOS 26	+
KEL	-	MOS 25	+
HEL	+	MOS 24	+
HT 1080	+	MOS 22	-
FIB 1	(+)	MOS 20	+
FIB 2	+	MOS 17	-
FIB 3	-	MOS 13	+

+=TRANSKRIPT POSITIV

-=TRANSKRIPT NEGATIV

(+) = FRAGLICHE POSITIVE EXPRESSION

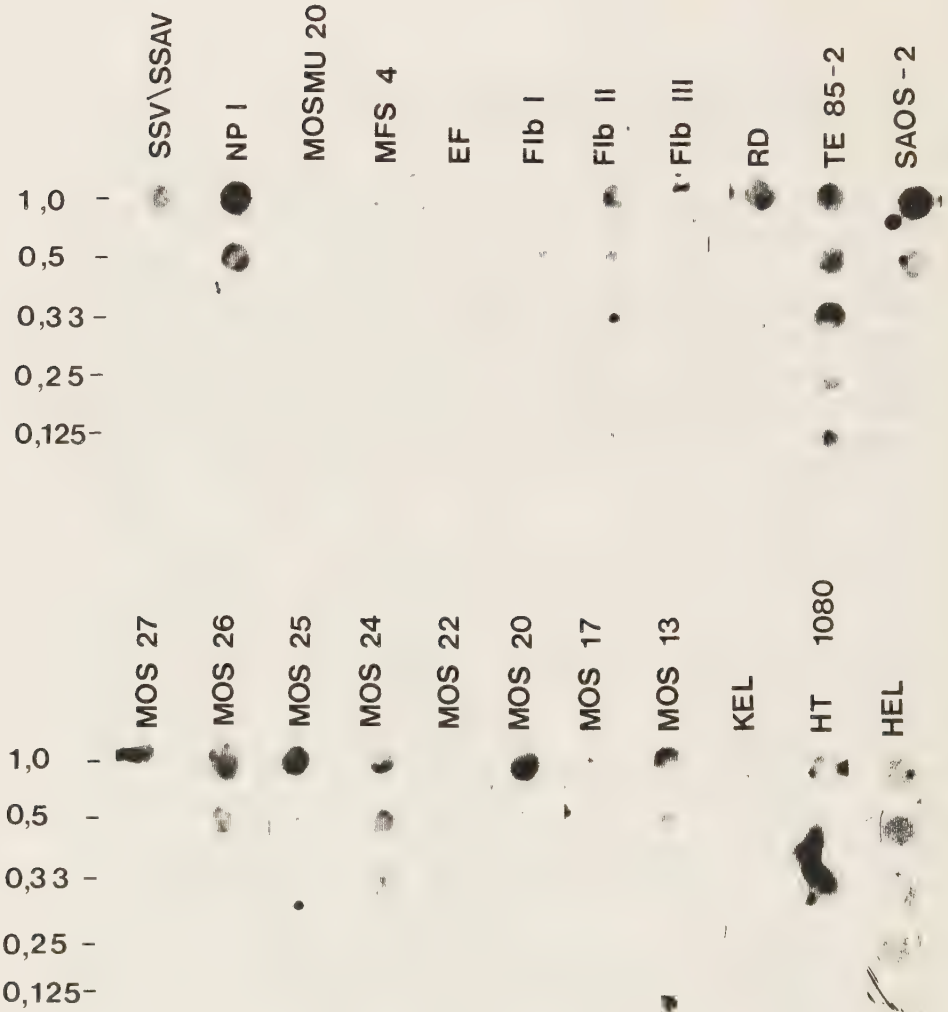


Abb. 3: "Dot-Blot" m-RNA Analyse und SIS Hybridisierung

Die Beschreibung der Kulturzellen entnehme man dem Text (siehe auch 3.1.1. und Tabelle 1)

Abb. 3 zeigt in 5 Spots für jede Zelle eine Verdünnungsreihe des präparierten Zellextrakts (vgl. 2.3.1.2.) der mit der Zellpräparation auf den Nitrocellulosefilter aufgetragenen mRNA. Von den 22 untersuchten Kulturzellen ist bei 13 in Abhängigkeit der mRNA-Verdünnung eine signifikante Schwärzung der jeweiligen Spots zu sehen. Bei diesen Kulturzellen ist von einer spezifischen Bindung der Probe an die c-SIS mRNA auszugehen.

Bei den Kulturzeilen handelt es sich um die beiden Positiv-Kontrollzellen SSV/SSAV und NP I, Die Osteosarkomkulturzellen TE 85/2, SAOS/2, MOS 26, MOS 25, MOS 24, MOS 20, MOS 13, ferner um die Fibrosarkomkulturzellen HT 1080, FIB II, die Rhabdomyosarkomkulturzelle RD und die megakaryozytäre Kulturzelle HEL. Aufgrund einer nur schwachen Schwärzung der Spots höchster mRNA-Konzentration bei der Osteosarkomkulturzelle MOS 27 und der Fibrosarkomkulturzelle FIB I im Vergleich mit den neg. Kontrollen MFS 4, MOSMU 20, konnte eine unspezifische Bindung der Probe nicht ausgeschlossen werden. Diese Zellen müssen daher als fraglich positiv angesehen werden.

Die nicht transformierten Fibroblasten MOS Mu 20 und MFS 4 (neg. Kontrollen),die embryonalen Fibroblasten EF, die Osteosarkomkulturzellen MOS 22, MOS 17 die Fibrosarkomkulturzelle FIB III, sowie die Narbenkeloidkulturzelle KEL zeigen nur eine minimale, nicht konzentrationsabhängige Schwärzung einzelner Spots. Da es sich hierbei sehr wahrscheinlich um eine unspezifische Bindung der Probe handelt, gehen wir davon aus,daß diese Zellen folglich keine c-SIS mRNA Expression zeigen.

- 3.3. Untersuchungen zur Expression der Transkripte des c-SIS, c-MYC und c-FOS Gens in einigen Kulturzellen mit Hilfe des "Northern Blot" Verfahrens.

3.3.1. c-SIS mRNA Expression

Für die Untersuchung wurden folgende Kulturzellen ausgewählt:

- a die SSV/SSAV und NP I Kulturzellen mit nachweisbarer v-SIS Expression im "Dot Blot" (siehe 3.2.) und Immunpräzipitation (siehe 3.4.2.). Sie dienten wieder als Positivkontrollzellen.
- b Die Kulturzellen RD und HEL mit gleichfalls signifikanter c-SIS-mRNA Expression im "Dot Blot" und bei der Proteinuntersuchung.
- c Die Osteosarkomkulturzellen MOS 26, MOS 24, MOS 13 aufgrund ihrer im "Dot Blot" vorhandenen positiven c-SIS Expression und der davon abweichenden fraglichen (MOS 26) bzw. fehlenden (MOS 24, MOS 13,) Expression des SIS-spezifischen Proteins p27.
- d Die EF und KEL Kulturzellen aufgrund ihrer negativen Expression im "Dot Blot", welcher der signifikanten Expression des SIS-spezifischen Proteins p27 gegenübersteht.
- e Die HT 1080 Kulturzelle zur Überprüfung der Molekülgröße der im "Dot Blot" nachweisbaren c-SIS mRNA.

Die Kulturzellen wurden zu einer für die Präparation der zellulären RNA ausreichenden Menge aufgezüchtet, in Lithiumchlorid / Harnstoff lysiert und die hierbei isolierte zelluläre RNA durch Phenolisierung gereinigt. Anschließend wurde die zelluläre RNA auf einer Oligo-dT Säule affinitätschromatographisch aufgetrennt, die hierbei gewonnene Poly A(+) RNA (mRNA) nach photometrischer Mengenbestimmung in Formaldehyd-Agarosegelen nach Molekülgröße analysiert und mit Molekulargewichtsmarkern verglichen.

Die durch den "Northern Blot" an Nitrocellulose gebundene mRNA wurde mit einer radioaktiv markierten c-SIS Probe hybridisiert und anschließend autoradiographiert. (vgl.2.3.2.) In Abb. 4 ist das Ergebnis der Hybridisierung der an Nitrocellulosefilter gebundenen mRNA mit einer radioaktiv markierten c-SIS Probe zu erkennen



Abb 4: "Northern Blot" m-RNA Analyse und SIS Hybridisierung

Die Beschreibung der Kulturzellen entnehme man dem Text (siehe auch 3.1.1. und Tabelle 1)

Eine Übersicht zu den Ergebnissen findet sich in Tabelle 3.

TABELLE 3

KULTURZELLE	MOLEKÜLGRÖSSE DER TRANSKRIPTE IN KB			M-RNA (GEHALT AUF DEM NITROCELLULOSEFILTER)
	SIS	MYC	FOS	
	3,4+5,7	4,2	2,7	2,2
SSV/SSAY	++	++	++	++++
NP 1	++	++	++	++
RD	++	++	++	++
HEL	++	+++	++	++
MOS 26		++	+	+
MOS 24				++
MOS 13				(+)
HT 1080		++	+	+
EF				+
KEL				+

++ - ++++ = SIGNIFIKANTE MENGE

+ = FUER SPEZ HYBRIDISIERUNG AUSREICHENDE MENGE

(+) = FUER SPEZ HYBRIDISIERUNG FRÄGLICH AUSREICHENDE

MENGE

Es zeigten sich bei beiden Kontrollzellen SSV/SSAV und NP 1 jeweils zwei Banden bei 3,4 und 5,7 kb. Diese Bandengrößen entsprechen den in der Literatur beschriebenen Größen für die mRNA SSV-transformierter Zellen (Johnsson et al., 1985b). Es fand sich ferner bei der RD Kulturzelle ein Transkript von 4,2 kb. Diese Molekülgröße stimmt mit den Molekülgrößenangaben der Literatur für das Transkript des c-SIS-Gens überein (Eva A. et al., 1982, Westin et al., 1982 b). Dieses positive Ergebnis der RD Kulturzelle wurde allerdings erst bei einer zweiten Isolierung von mRNA aus RD Zellen erzielt. Bei der ersten mRNA Präparation der RD Kulturzelle (nicht gezeigt) fand sich lediglich das myc Transkript.

Bei der Hybridisierung der mRNA der HEL Kulturzelle mit der c-SIS Probe konnte kein c-SIS Transkript nachgewiesen werden. Da sich das c-MYC Transkript darstellen ließ (vgl 3.3.2.), muß bei der HEL Präparation davon ausgegangen werden, daß bei intakter Gesamt-mRNA keine nachweisbaren Mengen eines c-SIS Transkripts vorhanden waren. Bei den übrigen Kulturzellen MOS 26 , MOS 24 , MOS 13 , HT 1080 , EF und KEL fand sich mit der "Northern Blot"- Analyse kein Anhalt für die Expression des c-SIS Transkripts.

3.3.2. c-MYC und c-FOS mRNA Expression

Im folgenden sollte untersucht werden, ob sich bei der Hybridisierung einer radioaktiv markierten c-MYC bzw. c-FOS Probe mit der am Nitrocellulosefilter gebundenen mRNA der in (3.3.1.) beschriebenen Kulturzellen ein c-MYC bzw. c-FOS Transkript nachweisen läßt. Hierzu wurde die an den Nitrocellulosefilter gebundene mRNA durch Dehybridisierung (2.3.2.5.3.) von der c-SIS Probe befreit, mit radioaktiv markierter c-MYC Probe hybridisiert und anschließend autoradiographiert. Bei der c-FOS Hybridisierung wurde das gleiche Verfahren angewandt. Die c-MYC Probe wurde durch Dehybridisierung entfernt, die RNA mit einer radioaktiven c-FOS Probe hybridisiert und autoradiographiert. Die Zuordnung der Ergebnisse der MYC und FOS Hybridisierung findet sich in Tabelle 3.

In Abb. 5 ist das Ergebnis der c-MYC Hybridisierung zu erkennen

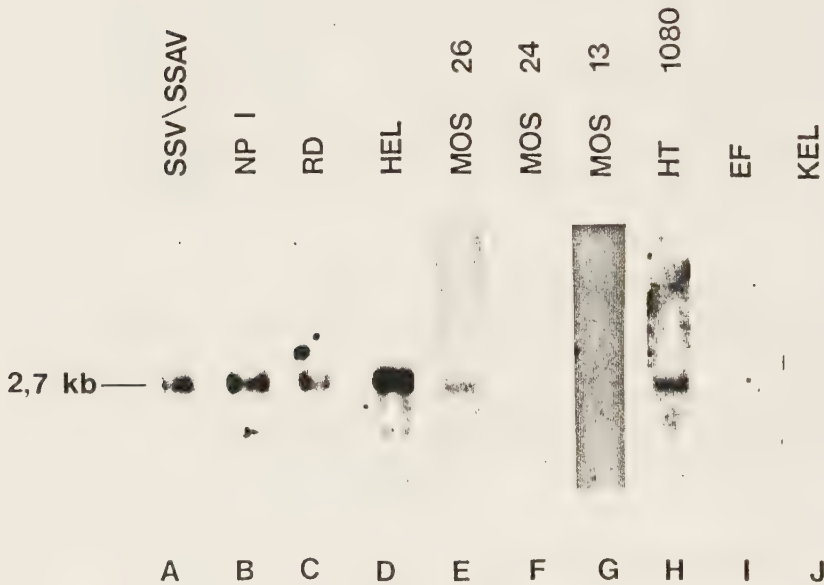


Abb 5: "Northern Blot" m-RNA Analyse und MYC Hybridisierung

Die Beschreibung der Kulturzellen entnehme man
dem Text (siehe auch 3.1.1. und Tabelle I)

Man sieht bei den Kulturzellen SSV/SSAV , NP1 , RD , HEL , MOS 26 , HT 1080 jeweils eine Bande bei 2,7 kb. Diese Molekülgröße stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Größenangabe für das c-MYC Transkript von 2,5 bis 2,7 kb (Sheiness et al., 1980, Gonda et al., 1982, Müller et al., 1983b) überein. Bei MOS 24 , MOS 13 , EF und KEL war ein c-MYC Transkript nicht vorhanden.

Abb. 6 zeigt das Ergebnis der c-FOS Hybridisierung

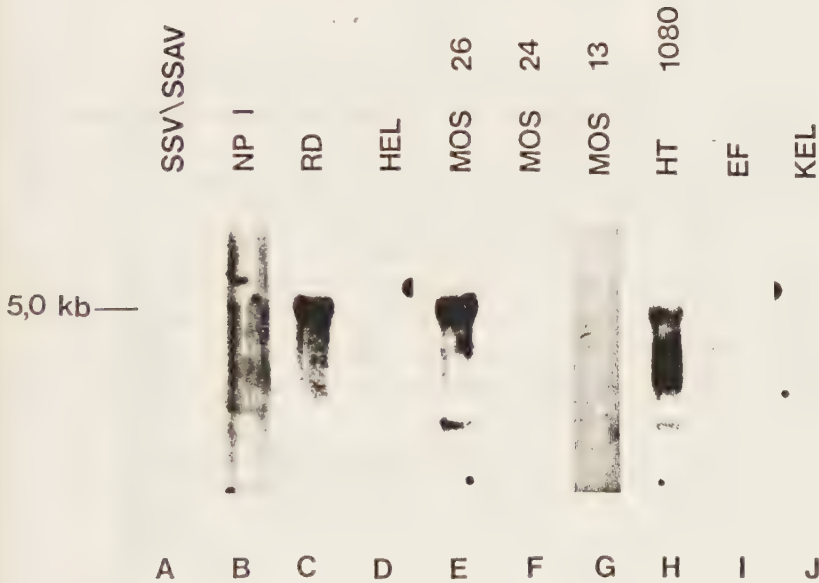


Abb 6: "Northern Blot" m-RNA Analyse und FOS Hybridisierung

Die Beschreibung der Kulturzellen entnehme man
dem Text (siehe auch 3.1.1. und Tabelle 1)

Bei den Kulturzellen NP I , MOS 26 und HT 1080 tritt eine Bande bei 2,2 kb auf. Auch diese Molekülgröße stimmt mit der für das c-FOS Transkript beschriebenen Größe von 2,2, kb (Müller et al., 1982, Müller 1983a) überein.

Die Schwärzung bei 5,0 kb entspricht vermutlich der unspezifischen Bindung der Probe an Reste der ribosomalen RNA. Nicht nachweisbar war das c-FOS Transkript bei den Kulturzellen SSV/SSAV , RD , HEL , MOS 24 , MOS 13 , EF und KEL .

3.3.3. Mengenabschätzung der aufgetrennten, an Nitro-cellulosefilter gebundenen mRNA nach Aktin-Hybridisierung

Um eine Aussage über die insgesamt an den Nitrocellulosefilter gebundene Menge mRNA machen zu können, wurde die mRNA mit radioaktiv markiertem Aktinprobe hybridisiert. Da Aktin in allen proliferierenden mesenchymalen Zellen gebildet wird, ist anhand der Schwärzung der Spuren im Autoradiogramm eine Mengenabschätzung der an den Nitrozellulosfilter gebundenen zellulären Gesamt-mRNA möglich.

Hierzu wurde die in (3.3.1. und 3.3.2.) beschriebene, an Nitrocellulosefilter gebundene mRNA durch Dehybridisierung von der c-FOS Probe befreit, mit radioaktiv markiertem Aktin DNA-Probe hybridisiert und anschließend autoradiographiert (vgl. 2.3.2.5.). Die Zuordnung der Ergebnisse der mRNA Mengenabschätzung durch Aktin-Hybridisierung bei den Kulturzellen findet sich in Tabelle 3.

Abb. 7 zeigt das Ergebnis der Aktin-Hybridisierung.

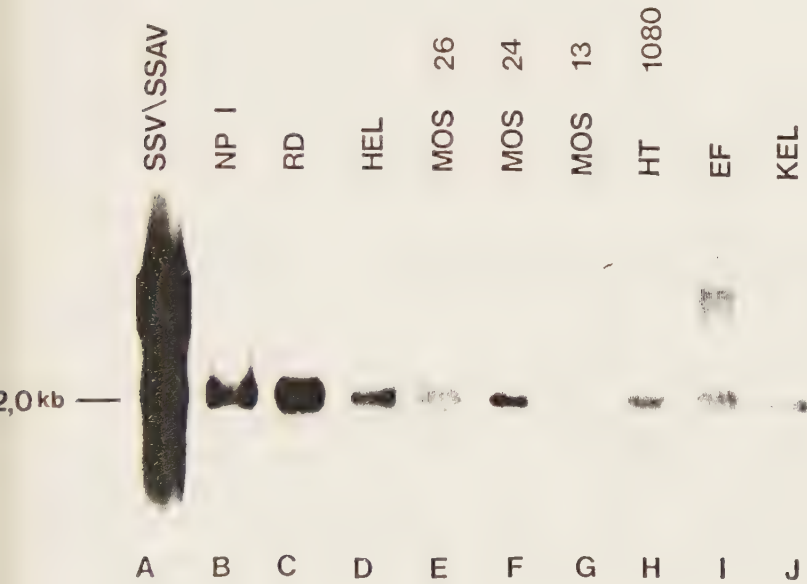


Abb 7: m-RNA Mengenabschätzung durch die "Northern-Blot"

-Analyse nach Aktin- Hybridisierung

Die Beschreibung der Kulturzellen entnehme man
dem Text (siehe auch 3.1.1. und Tabelle 1)

Anhand der Schwärzung der jeweiligen Spuren der Kulturzellen und der bei diesem Schwärzungsgrad stattfindenden spezifischen Hybridisierung mit einer spezifischen Probe (3.3.1. und 3.3.2.), konnte bei allen Kulturzellen bis auf MOS 13 auf, für eine spezifische

Hybridisierung ausreichende Menge mRNA, geschlossen werden.

Bei EF, KEL signalisiert die Schwärzung zwar eine für die Hybridisierung mit einer spezifischen Probe ausreichende Menge m-RNA, was allerdings nicht verifizierbar war, da keine Hybridisierung mit einer spezifischen Probe stattfand. Banden bei 5,0 kb stammen von der unspezifischen Hybridisierung mit Resten ribosomaler RNA. Die über die gesamte Spur A verteilte intensive Schwärzung bei der SSV/SSAV Kontrollkulturzelle läßt sich auf große Mengen m-RNA zurückführen, die die Trennkapazität des Agarosegels überstiegen. Verantwortlich für die große Menge m-RNA ist vermutlich die überaus starke v-SIS Transkription in proliferierenden SSV/SSAV Kulturzellen.

3.4.4. Zusammenfassung der c-SIS- c-MYC- und c-FOS- Gen-Expression für die untersuchten Kultur- zellen

In einzelnen soll hier die in den Abb. 5, 6 und 7 dargestellte Co-Expression der c-SIS, c-MYC und c-FOS Gene in manchen untersuchten Kulturzellen aufgezeigt werden.

Zur Übersicht dient die Tabelle 3 und 6. Die Kulturzellen SSV/SSAV (Abb. 4, 5, und 6), NP 1 (siehe Abb. 4, 5 und 6), und RD (z Abb. 4, 5, und 6) exprimieren sowohl das c-SIS- als auch das c-MYC- nicht aber das c-FOS-Gen. Nur c-MYC-Expression zeigt die mRNA Präparationen der HEL Kulturzelle (Abb. 4, 5, und 6). c-MYC- und c-FOS-Expression, nicht aber c-SIS-Gen-Expression zeigen MOS 26 (Abb. 4, 5, und 6) und HT 1080 (Abb. 4, 5, und 6). Ohne Expression eines der drei Onkogene blieben die Kulturzellen MOS 24 (Abb. 4, 5, und 6), MOS 13 (Abb. 4, 5, und 6), EF (Abb. 4, 5, und 6) und KEL (Abb. 4, 5, und 6). Bei der Kulturzelle MOS 13 ist aufgrund der in (3.4.3.) abgeschätzten geringen Menge mRNA die Hybridisierung mit einer spezifischen Probe fraglich, so daß die Expression der drei Onkogene nicht sicher beurteilt werden kann.

3.4. Proteinuntersuchung

3.4.1. Nachweis eines v-SIS-spezifischen Precursor Proteins in der SSV transformierten Kontrollzelle SSV/SSAV

Es sollte gezeigt werden, daß das bei den folgenden mittels Immunpräzipitation durchgeführten Untersuchungen verwendete Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS) spezifisch für das vom v-SIS-Onkogenprodukt p28SIS ist, welches von SSV-infizierten Zelle primär exprimiert wird. Zu Beginn dieser Studie wurden zunächst Versuche mit einem anti-PDGF Immenserum (zur Verfügung gestellt von Dr.B.Westermarck, Upsala) unternommen. Dieses Immenserum ist gegen beide PDGF-Ketten gerichtet. Die Ergebnisse blieben jedoch vermutlich aufgrund einer geringen Immunaffinität dieses Serums unbefriedigend. Das verwendete Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS) zeigte sich demgegenüber als sehr wirkungsvoll. Es ist gegen das C-terminale Ende dieses Proteins bzw. der PDGF-B-Kette gerichtet (vgl. 2.4.3.1.). Es erfäßt somit SIS-spezifische Proteine, welche am C-terminalen Ende noch keine proteolytische Spaltung erfahren haben (vgl. Einleitung). Als Kontrolle diente normales Kaninchenserum (vgl. 2.4.3.1.). Die verwendete SSV-infizierte Kulturzelle SSV/SSAV zeigt sowohl im "Dot Blot" als auch in der "Northern Blot"-Analyse die Expression eines v-SIS-Transkripts. Nicht so die korrespondierende, nicht virusinfizierte Kontrollzelle MFS 4, bei welcher im "Dot Blot" kein SIS-Transkript nachweisbar war. (vgl. 3.2.)

SSV/SSAV und MFS 4 Zellen wurden mit ³⁵S Methionin radioaktiv markiert, lysiert und immunpräzipitiert (vgl. 2.4.). Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen auf SDS-Gelen elektrophoretisch nach Molekulargröße aufgetrennt und autoradiographiert. Abb. 8 zeigt die durch Immunpräzipitation isolierten Proteine. Mit dem Antiserum (anti-C-term./SIS). (Spur D) wurde bei der SSV-infizierten SSV/SSAV-Zelle ein spezifisches Protein präzipitiert, welches mit dem Markerprotein des Molekulargewichts 27000 d in etwa auf gleicher Höhe liegt. Da die Proteine unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurden, handelt es sich um ein Monomer. Dieses Protein ist höchstwahrscheinlich das beschriebene (siehe Einleitung) p28SIS -Produkt.

Die nicht infizierte MFS 4 Zelle (Spur B) zeigt mit dem gleichen Kaninchenantiserum kein Protein im Bereich von 27 kd. Mit dem verwendeten normalen Kaninchenkontrollserum konnte bei beiden Kulturzellen (Spur A, Spur B) kein Protein dieser Größenordnung präzipitiert werden.

Zu den anderen Banden: Für die Interpretation der im Proteinteil abgebildeten Autoradiogramme ist wichtig zu wissen, daß man in den Zelllysaten bzw. Zellkulturmedien der Kulturzellen eine Vielzahl von Proteinen findet, die unspezifisch mit Kaninchen-Immunseren reagieren. Dies erklärt die vergleichsweise große Anzahl an Proteinbanden die mit den verwendeten Kaninchenserum präzipitiert wurden. Die Banden die sowohl mit dem SIS- spez. Kaninchenimmunserum als auch mit dem Kaninchenkontrollserum präzipitiert wurden sind folglich auch nicht SIS spezifisch.

Zu den Markerproteinen sollte angemerkt werden, daß sich, bedingt durch unterschiedliche Gelsysteme und methodische Abweichungen in der Proteinanalyse der einzelnen Autoren, innerhalb eines Toleranzbereichs Schwankungen der Molekularen Größenangabe für ein und das selbe Protein ergeben können. In den Proteinuntersuchungen dieser Studie dient das AMV-Molekül im Bereich von 27 kd als Referenz. Die molekulare Größe von ca. 27 kd des Markerproteins umfaßt daher einen gewissen Toleranzbereich, der durchaus mit der Molekülgröße z.B. von p28SIS vereinbar ist.

Bezüglich der Literatur können sich somit kleinere Abweichungen in den Molekülgrößenangaben der untersuchten Proteine ergeben.



Abb. 8: Darstellung des SIS spezifischen Precursorproteins p28SIS in der SSV-infizierten SSV/SSAV-Kulturzelle.
 A= Kontrolle (Kaninchenserum)
 B= anti-SIS-Serum (Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS))
 Die Beschreibung der Kulturzellen entnehme man dem Text (siehe auch 3.1.1. und Tabelle 1)

SSV-infizierte SSV/SSAV-Zellen und nicht infizierte MFS 4 Zellen, zu einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen / Petrischale gezüchtet, wurden 12 Stunden mit ^{35}S -Methionin markiert. Die Zellen wurden lysiert und Proteine durch Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt und mit Kontroll- und Antiserum immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Proteine unter reduzierenden Bedingung in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Molekulargewichtsmarkern verglichen.

3.4.2. Nachweis eines c-SIS-spezifischen Proteins in den untersuchten Kulturzellen.

In Abschnitt 3.4.1. konnte gezeigt werden, daß sich mittels des im folgenden verwendeten anti-C-terminalen Kaninchenantiseraums (anti-C-term./SIS), ein v-SIS-spezifisches Protein von 27000 d aus Lysaten von SSV-infizierten Zellen präzipitieren ließ welches dem in der Literatur beschriebenen (Robbins et al., 1983,1985) p28SIS entsprechen dürfte.

ES sollte überprüft werden, ob bei positiver bzw. negativer Expression des c-SIS-Transkripts in nicht SSV-infizierten Zellen eine Translation zu c-SIS-spezifischen Proteinen stattfindet.

Da das v-SIS-Genprodukt p28SIS mit PDGF immunologisch verwandt ist (Robbins et al., 1983) und der noch nicht proteolytisch gespaltene Precursor p28SIS in der Aminosäuresequenz ca 96% Homologie mit der PDGF B-Kette aufweist (Abb 2), ist zu erwarten, daß es sich bei dem Precursor-Protein von c-SIS exprimierenden Zellen gleichfalls um ein Glycoprotein der Molekülgröße um 28000 d handelt.

Aus diesem Grund wurde bei der folgenden Untersuchung nach Proteinen gesucht, die im Molekulargroßenbereich des p28SIS liegen. Bei der Immunpräzipitation kamen das anti-C-terminale Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS), und normales Kaninchenserum als Kontrolle zur Anwendung. In Abhängigkeit der in 3.2. vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Expression von c-SIS bzw. v-SIS Transkripten wurden 16 der im "Dot Blot" erfaßten zusätzlich zu den dort nicht erfaßten Zellen MOS 19 und PLC/PRF 5 untersucht. Die untersuchten Kulturzellen finden sich in Tabelle 4 und 6.

Die Zellen wurden zu einer gleichmäßigen Zelldichte von 1×10^7 / Petrischale gezüchtet, radioaktiv markiert, lysiert und die Proteine immunpräzipitiert (vgl. 2.4.3.) Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen auf SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch nach Molekülgrößen aufgetrennt und mit Molekülgrößenmarkern verglichen und autoradiographiert. In Abb. 9a+b sind die untersuchten Kulturzellen im Vergleich zu den Positiv-Kontrollzellen SSV/SSAV und NP 1 (Non Producer) sowie zu den Negativ-Kontrollzellen PLC/PRF 5 und MOS Mu 20 dargestellt.

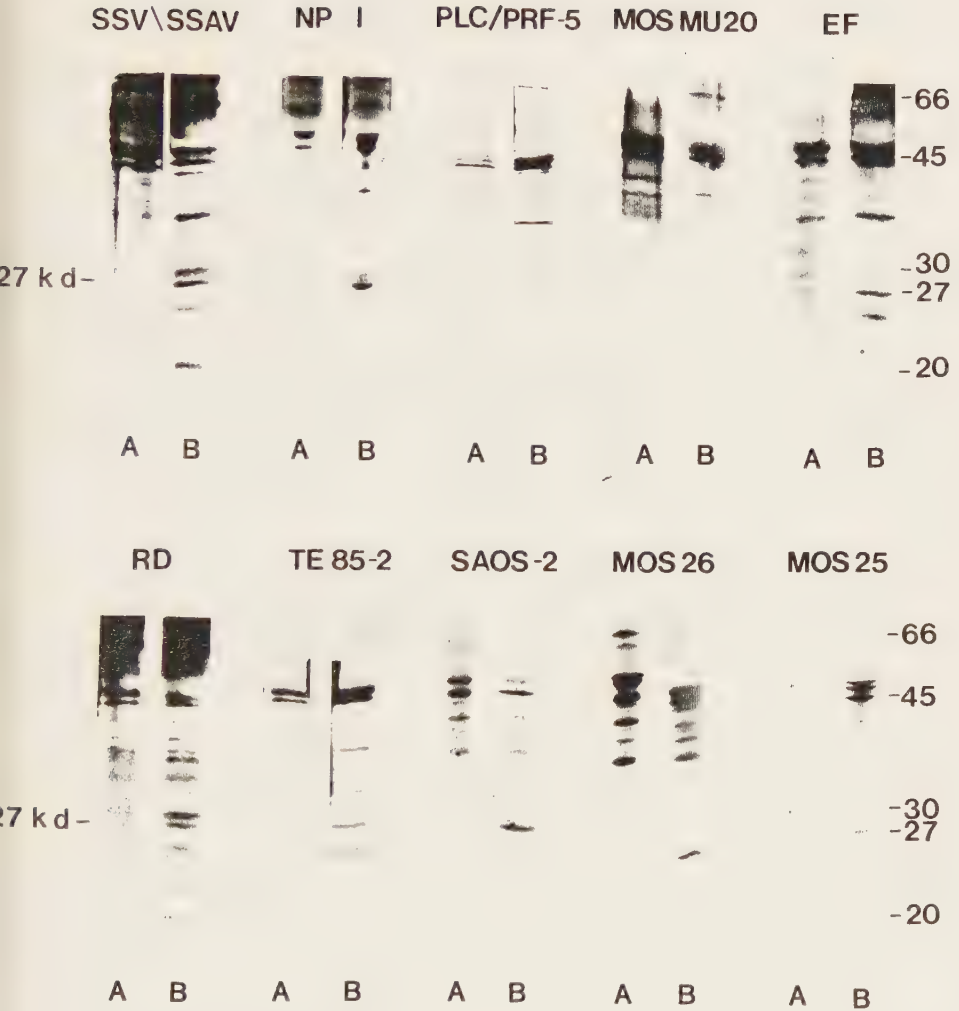


Abb. 9a

Abb 9a+b: Darstellung SIS spezifischer Proteine

A= Kontrolle (Kaninchenserum)

B= anti-SIS-Serum (Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS))

Die Beschreibung der Kulturzellen entnehme man

dem Text (siehe auch 3.1.1. und Tabelle 1)

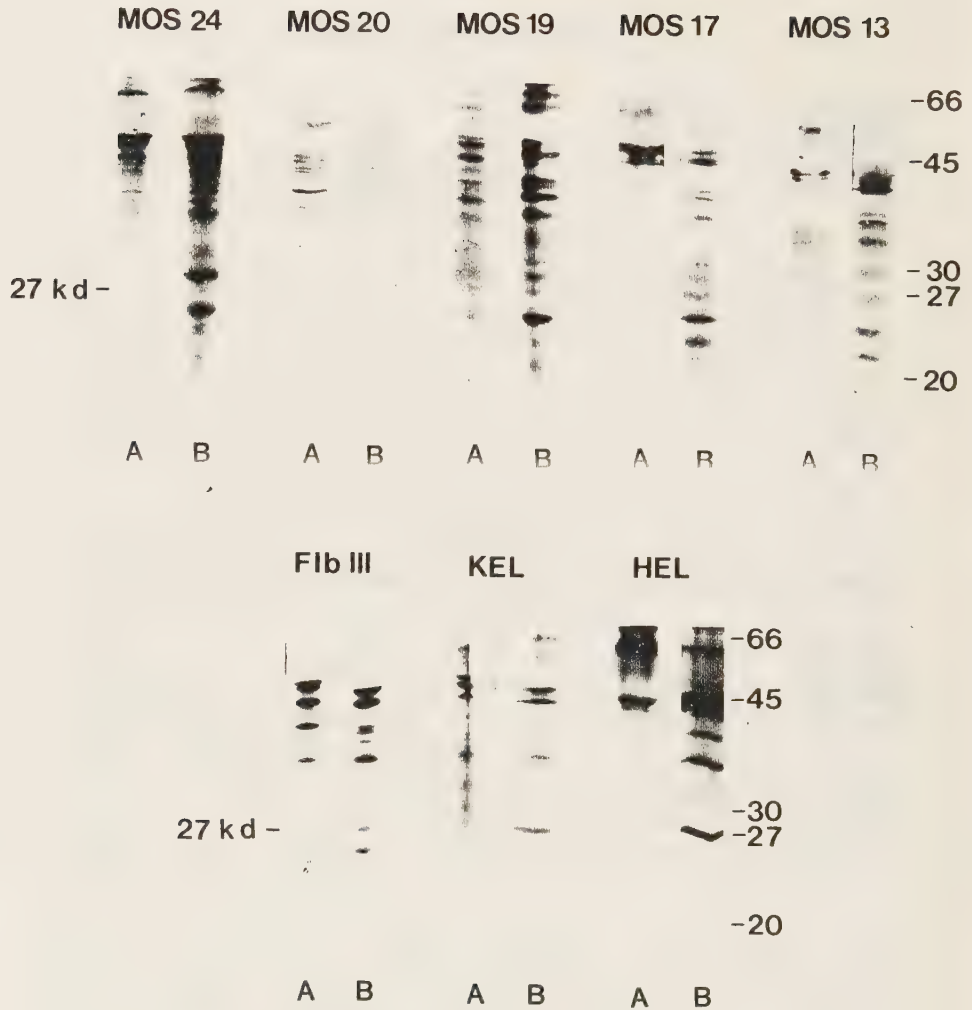


Abb.9b

Abb 9a+b: Darstellung SIS spezifischer Proteine

A= Kontrolle (Kaninchenserum)

B= anti-SIS-Serum (Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS))

Die Beschreibung der Kulturzellen entnehme man dem Text (siehe auch 3.1.1. und Tabelle I)

Proteinbanden gleicher Molekulargröße, welche sowohl mit Kontroll- bzw. mit dem spezifischen Antiserum zur Darstellung kamen, werden, da es sich um unspezifisch reagierende Proteine handelt, nicht weiter besprochen und aufgelistet.

Der Molekülgrößenbereich zwischen den beiden Markerproteinen von 45 und 66 kd kann wegen der in diesem Molekülgrößenbereich in hoher Konzentration vorhandenen schweren Ketten der Antikörper der verwendeten Kaninchenserum nicht beurteilt werden. In der Abbildung ist die Spur des normalen Kaninchenkontrollserums mit A, die des Antiserums (anti-C-term./SIS) mit B bezeichnet. Ein Übersichtsschema der spezifischen Banden findet sich in Tabelle 4. Dort sind die mit dem spezifischen Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS) präzipitierten spezifischen SIS Proteine nach Proteingröße und nach Stärke der jeweiligen Proteinbande aufgelistet.

Es konnte mit dem anti-SIS-Kaninchenserum (anti-C-term./SIS) bei 11 Kulturzellen eine signifikante Proteinbande eines SIS-spezifischen Proteins bei 27 kd nachgewiesen werden. Dieses Protein im weiteren p27 genannt, liegt im Bereich der Molekülgröße des viralen v-SIS-Precursor p28SIS

Zu diesen Kulturzellen zählten die beiden SSV-transformierten Positiv-Kontrollzellen SSV/SSAV und NP 1 (Non Producer), die Osteosarkomkulturzellen TE 85/2, SAOS/2, MOS 25/2, die Rhabdomyosarkomkulturzelle RD, die Fibrosarkomkulturzelle FIB III, die embryonalen Fibroblasten EF, die Narbenkeloidkulturzelle KEL und die megacaryocytaire Kulturzelle HEL. Aufgrund der sehr schwachen Intensität der Banden der Molekulargröße von 27 kd bei den drei Osteosarkomkulturzellen MOS 26, MOS 19, MOS 17 liefern diese Kulturzellen keinen sicheren Nachweis des SIS-spezifischen Proteins p27.

Bei den Osteosarkomkulturzellen MOS 24, MOS 20, MOS 13, den Negativ-Kontrollzellen PLC/PRF 5 und MOS Mu 20 (menschliche Fibroblasten), ließ sich ebenfalls kein Nachweis SIS-spezifischen Proteins p27 erbringen. Das signifikante Auftreten eines weiteren SIS-spezifischen Proteins bei 25 kd wurde bei 11 der 14 mesenchymalen Kulturzellen beobachtet. Darunter befanden sich die SSV-transformierten Positiv-Kontrollzellen SSV/SSAV, die Osteosarkomkulturzellen MOS 26, MOS 24, MOS 19, MOS 17, MOS 13, TE 85/2, die Rhabdomyosarkomkulturzellen RD, die Fibrosarkomkulturzellen FIB III, die

embryonalen Fibroblasten EF und die Negativkontrollzelle MOS Mu 20. Die Narbenkeloidkulturzellen KEL und die Osteosarkomkulturzellen MOS 25 sind aufgrund der schwachen Intensität der Bande bei 25 kd nicht beurteilbar. Eine spezifische Bande dieser Molekülgröße fehlt bei den Kulturzellen nicht mesenchymaler Herkunft wie PLC/PRF 5 und HEL, ferner bei den Osteosarkomkulturzellen SAOS/2 und MOS 20. Die SSV-infizierte Kulturzelle NPI zeigt ebenfalls kein Protein dieser Größe. Bei der Kulturzelle MOS 19 findet sich mit dem Kontrollserum bei 25 kd eine schwache Bande, die jedoch unspezifisch (technisch bedingt) sein dürfte.

Die Proteinbande von 20 kd bei der Kulturzelle SSV/SSAV entspricht in ihrer Molekülgröße einem SIS Protein SSV transformierter Fibroblasten das bei (Robbins et al., 1983, 1985) beschrieben ist. Eine Proteinbande von 20 kb findet man auch bei RD, FIB 3 und MOS 26. In Abb. 8 (3.4.1.) sieht man die Proteinbande bei der SSV/SSAV Kulturzelle jedoch nicht. Dies ist vermutlich damit zu erklären, daß die bei dieser Präzipitation verwendete Charge des anti-SIS Kaninchenimmunsersums (anti-C-term./SIS) aus einer frühen Blutentnahme des Kaninchens samnte, und somit möglicherweise einen geringeren Antikörpertiter hatte als die Charge der späteren Blutentnahme, die für alle weiteren Immunpräzipitationen verwendet wurde. Bei den übrigen präzipitierten Proteinen der Abb 8,9 von 34,32,31,30,29, 23, 22,kd lassen sich keine signifikanten Häufungen bzw. Zuordnungen bei, bzw. zu bestimmten Kulturzellen nachweisen oder ableiten. Sie sind vermutlich unspezifisch.

Die Zuordnung der wesentlichen SIS-spezifischen Proteinbanden zu den jeweiligen Kulturzellen entnehme man aus Tabelle 4.

TABELLE 4

MOLEKÜLGRÖÖE DER PROTEINE IN kd

KULTURZELLEN	29	27	25	20
SSV/SSAV		++	++	++
NP 1		++		
PLC/PRF 5				
MOS MU 20			+	
MFS 4			+	
EF		+++	++	
KEL		++	(+)	
HEL		+++		
FIB 3	(+)	++	+++	+
RD	++	++	++	++
TE 85-2		++	++	
SAOS 2		++		
MOS 26	(+)	(+)	+++	(+)
MOS 25		++	(+)	
MOS 24	++		++	
MOS 20				
MOS 19	(+)	(+)	++	
MOS 17	(+)	(+)	++	
MOS 13			++	

DIE TABELLE ZEIGT DIE IM RAHMEN DIESER ARBEIT
WESENTLICHEN, SIGNIFIKANTEN SIS-SPEZIFISCHEN
PROTEINBANDEN.

+++ = BANDE STARKER INTENSITAET

++ = BANDE MITTLERER INTENSITAET

+ = BANDE SCHWACHER INTENSITAET

(+)= BANDE NICHT SICHER ZU BEURTEILEN
(FRAGLICH POSITIV)

3.4.3. Untersuchung zur Sezernierung c-SIS-spezifischer Proteine durch die Kulturzellen.

3.4.3.1 Immunpräzipitation SIS-spezifischer, intrazellulärer und sezernierter Proteine aus Zelllysaten und korrespondierenden Zellmediumüberständen einiger Kulturzellen.

Die Sezernierung der Proteine von in Kultur gehaltenen Zellen führt zu einer Anreicherung dieser Proteine in dem die Zellen umgebenden Zellkulturmedium. Bei den sezernierten c-SIS-spezifischen Proteinen sind kleine Monomermoleküle von 11 und 13 kd zu erwarten, da sie vermutlich durch die intrazelluläre Spaltungsreifung eines-Precursor Moleküls entstehen (vgl. Einleitung).

Die proteolytisch gespaltenen kleineren Sezernierten Proteine haben ihr C- und N-terminales Ende verloren. (vgl. Einleitung) Sie sind daher mit einem gegen das C-terminale Ende des SIS-Proteins gerichteten Antiserums nicht nachweisbar. Ein Antiserum, welches gegen die Mitte des Proteins gerichtet ist, sollte im folgenden auch die proteolytisch gespaltenen Endprodukte eines c-SIS p28 Precursor-Moleküls zur Darstellung bringen. Anti-internene Immunsereen wie das erwähnte anti-PDGF Immunsereum oder das folgend verwendete anti-SIS Kaninchensereum (anti-intern/SIS), besitzen allerdings scheinbar eine wesentlich geringere Immunaffinität als das anti-C-terminale SIS Kaninchensereum (anti-C-term./SIS).

Um sezernierte und intrazelluläre Proteine im Vergleich zu zeigen, wurden neben den Medienüberständen die korrespondierenden Kulturzellen auf c-SIS-spezifische Proteine untersucht. Exemplarisch wurden 6 verschiedene Kulturzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft und Eigenschaften (vgl. 2.1., 1.4.) ausgewählt, um ein Spektrum unterschiedlicher Zellen zu erhalten.

Es handelt sich dabei um 5 Kulturzellen, die das SIS-spezifische Protein p27 exprimieren. Es handelt sich dabei um HEL, KEL, NP 1, SAOS/2 und TE 85/2. Ferner wurde MOS 26 aufgrund einer fraglichen Expression dieses SIS-spezifischen Proteins und zur Verifizierung

einer möglichen Spezifität des Proteins von 25 kd erfaßt.

Die zu einer gleichmäßigen Dichte gezüchteten Zellen wurden mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Nach Beendigung der Zellmarkierung, wurde der Medienüberstand geerntet, durch Zentrifugation gereinigt, die Proteine durch Ammoniumsulfatfällung angereichert, immunpräzipitiert und in SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Die zu den Medienüberständen korrespondierenden Zellen wurden nach der Ernte des Medienüberstandes lysiert, die Proteine immunpräzipitiert und in 15% SDS-Polyacrylamidgelen analysiert.

Die Auftrennung der Proteine im Gel fand unter reduzierenden Bedingungen statt. Für die Immunpräzipitation wurde das Antiserum (anti-intern/SIS) und normales Kaninchenserum als Kontrolle verwendet

Im Unterschied zur Immunpräzipitation mit dem anti-SIS-Kaninchenimmunserum (anti-C-term./SIS) der Abb. 9a+b, zeigt Abb. 10 vergleichend die Proteine des Medienüberstandes und die der korrespondierenden Zellen, präzipitiert durch das Antiserum (anti-intern/SIS) (Spur B und D) und durch das Kaninchenkontrollserum (Spur A und C). Spur A und B sind das Immunpräzipitat der Proteine der korrespondierenden Kulturzellen, Spur C und D sind das Immunpräzipitat der Proteine der Zellmedienüberstände.



Abb. 10: Darstellung SIS-spezifischer, intrazellulärer und sezernierter Proteine

A= Zelllysate: Kontrolle (Kaninchenserum)

B= Zelllysate: anti-SIS-Serum (Kaninchenantiserum (anti-intern/SIS))

C= Kulturmedienüberstand: Kontrolle (Kaninchenserum)

D= Kulturmedienüberstand: anti-SIS-Serum (Kaninchenantiserum (anti-intern/SIS))

Die Beschreibung der Kulturzellen entnehmen man dem Text (siehe auch 3.1.1. und Tabelle 1)

TABELLE 5

MOLEKÜLGRÖÖE DER ZELLINTERNEN PROTEINE IN kd

<u>KULTURZELLEN</u>	<u>27</u>	<u>26</u>	<u>25</u>	<u>24</u>	<u>22</u>	<u>16</u>	<u>13</u>	<u>11</u>
NP 1							(+)	(+)
HEL	+++		++					
TE 85-2					+	+++	+	
MOS 26			++					
KEL								
SAOS 2	++	++		+++			++	++

MOLEKÜLGRÖÖE DER SEZERNIERTEN PROTEINE IN kd

<u>KULTURZELLEN</u>	<u>27</u>	<u>26</u>	<u>25</u>	<u>24</u>	<u>22</u>	<u>16</u>	<u>13</u>	<u>11</u>
NP 1								
HEL								
TE 85-2			+++	+	++		+++	
MOS 26								
KEL								
SAOS 2				++	+		++	

DIE TABELLE ZEIGT DIE IM RAHMEN DIESER ARBEIT
WESENTLICHEN SIGNIFIKANTEN SIS-SPEZIFISCHEN
PROTEINBANDEN.

+++ = BANDE STARKER INTENSITAET

++ = BANDE MITTLERER INTENSITAET

+ = BANDE SCHWACHER INTENSITAET

(+)= BANDE NICHT SICHER ZU BEURTEILEN
(FRAGLICH POSITIV)

Es finden sich lediglich in den Zellmedienüberständen der TE 85/2 und SAOS/2 Kulturzellen spezifische Proteine der Größe 25, 22, 13 kd. Der SAOS/2 Medienüberstand zeigt darüberhinaus eine schwache, fragliche spezifische Bande bei 27 kd.

Das korrespondierende Zelllysate zeigt für SAOS/2 Proteinbanden der Größe 28, 26, 24, 14, 11 kd. Die Bande bei 25 kd entspricht in ihrer Molekülgröße der des SAOS/2 Medienüberstandes. Das TE 85/2 Zelllysate zeigt bei 22, 20, und 16 kd spezifische Proteinbanden. Die Bande bei 22 kd ist vergleichbar der des TE 85/2 Zellmedienüberstandes.

In den Medienüberständen der übrigen Kulturzellen, NP 1, MOS26, HEL und KEL waren keine spezifischen Proteinbanden nachweisbar. Die Zelllysate der korrespondierenden Kulturzellen zeigen bei MOS 26 eine spezifische Proteinbande bei 25 kd, bei HEL wesentliche spezifische Banden bei 25 und 27 kd und ferner bei NP 1 fragliche spezifische Banden zwischen 11 und 13 kd. Im KEL Zelllysate konnten keine SIS-spezifische Proteine nachgewiesen werden.

Banden, welche gleichzeitig mit dem spezifischen Antiserum (anti-intern/SIS) und mit dem Kontrollserum erscheinen, wurden aus den bereits in 3.3.2. genannten Gründen als unspezifisch betrachtet und nicht weiter besprochen.

Eine Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen Molekülgröße von 11 und 13 kd (Johnsson A. et al., 1985b, Shimokado et al., 1985) für sezernierte und unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennte SIS-spezifische Proteine ergibt sich für dieses Protein bei 13 kd der Zellmedienüberstände der Kulturzellen TE 85/2 und SAOS/2. Ein Protein von 11 kd findet sich im Zelllysate der SAOS/2 Kulturzelle.

Die Zuordnung der wesentlichen SIS-spez. Proteinbanden des Zelllysats bzw. des korrespondierenden Zellkulturmediums zu den entsprechenden Kulturzellen entnehme man auch aus Tabelle 5.

TABELLE 6

KULTURZELLEN	M-RNA (NAJ-METHODE)		SIS-SPEZ. PROTEINE			M-RNA (NORTHERN BLOT)	
	SIS		INTRAZELLULÄR 25KD (ANDERE)	13KD (ANDERE)	SEZERNIERT 11KD (ANDERE)	SIS	MYC FOS
SSV/SSAV	+		+	+		+	+
NP 1	+		+	+		+	+
PIC/PRF 5			-	+			
MOS MU 20	-		+				
MFS 4	-		+				
EF	-		+				
KEL	-		+	+		-	-
HEL	+		-	+		-	-
HT 1080	+					-	+
FIB 1	(+)						
FIB 2	+						
FIB 3	-						
RD	+		+	+			
TE 85-2	+		+	+		+	+
SAOS 2	+		-				
MOS 27	(+)						
MOS 26	+		+				
MOS 25	+		+				
MOS 24	+		+				
MOS 22	-		-				
MOS 20	+		-				
MOS 19			(+)				
MOS 17	(+)		+				
MOS 13	+		+				

+ = POS. EXPRESSION (+) = PRGL. POS. EXPRESSION - = NEG. EXPRESSION

4. Zusammenfassung der Ergebnisse der mRNA und Proteinuntersuchungen

Zunächst sei hier auf die Tabelle 6 verwiesen, in welcher im Überblick die SIS-Protein-Expression zur SIS-mRNA-Expression im "Dot Blot" und in der "Northern Blot"-Analyse für die jeweilige Zelllinie aufgezeigt ist. Die c-MYC- und c-FOS-Expression der mittels "Northern Blot"-Analyse untersuchten Kulturzellen ist dort ebenfalls dargestellt.

Bei den Ergebnissen ergeben sich die folgenden Konstellationen:

- A Ergebnisse der "Northern Blot"- und Zellmedienüberstandsuntersuchung bei positiver SIS-mRNA-Expression im "Dot Blot" und der positiven Expression eines SIS-spezifischen Proteins p27.

Die hier erwähnten Ergebnisse der "Northern Blot" Untersuchung der Kulturzellen SAOS 2, TE 85/2 und MOS 25 wurden in einer anderen Studie (Rainer Brachmann, Dissertation, LMU) durchgeführt und sind zur Ergänzung der folgenden Ausführungen mitaufgeführt. Für 6 Zellkulturen ergab sich im "Northern Blot" Verfahren ergänzend der Nachweis von v-SIS-Transkripten von 3,4 und 5,7 kb für die SSV/SSAV und NPI Kulturzelle und von 4,2 kb für die Osteosarkomkulturzellen TE 85/2, SAOS 2, MOS 25 und die Rhabdomyosarkomkulturzelle RD.

All diese Kulturzellen exprimierten gleichfalls das c-MYC-Transkript. Das c-FOS-Transkript wurde in den SAOS 2, TE 85/2 Kulturzellen als Molekül von 2,2 kb nachgewiesen. Für die megacaryozytäre HEL-Kulturzelle, gleichfalls mit positiver Expression des SIS-spezifischen Proteins p27 und einer c-SIS mRNA im "Dot Blot" ergab sich in der "Northern Blot"-Analyse nur die Expression des c-MYC-, nicht aber die des c-SIS- und c-FOS-Gens.

Von den 4 aus dieser Gruppe auf sezernierte, SIS-spezifische Proteine, untersuchten Kulturzellen NPI, HEL, SAOS 2 und TE 85/2 fanden sich bei den zwei Kulturzellen SAOS 2 und TE 85/2 im Immunpräzipitat der Zellkulturmedienüberstände ein SIS-spezifisches Protein der Größe 13 kd. Im korrespondierenden Zelllysat der SAOS 2 Kulturzelle kam ferner ein SIS-spezifisches Protein von 11 kd zur Darstellung. Im Zellkulturmedium der Kulturzellen NPI und HEL konnten keine SIS-spezifischen Proteine nachgewiesen werden. In den korrespondierenden Zelllysaten der 4 Kulturzellen fanden sich noch einige weitere

Proteine. Deren Molekülgröße und Zuordnung zu den einzelnen Kulturzellen findet sich in Tabelle 5.

B Ergebnisse der "Northern Blot"- und Zellmedienüberstandsuntersuchung bei positiver c-SIS-mRNA-Expression im "Dot Blot" und der negativen bzw. fraglich positiven Expression des SIS-spezifischen Proteins p27.

Die 3 Zelllinien MOS 26, MOS 24 und MOS 13 zeigen bei positiver Expression einer c-SIS mRNA im "Dot Blot" keine bzw. eine fraglich positive Expression eines SIS-spezifischen Proteins von 27 kd. Bei der "Northern Blot" Untersuchung dieser 3 Zelllinien ergab sich nur bei MOS 26 die Expression des c-MYC- und c-FOS-Gens. MOS 24 und MOS 13 blieben ohne nachweisbare Expression, wobei bei MOS 13 nicht beurteilt werden konnte ob die zur Verfügung stehende mRNA für eine spezifische Hybridisierung ausreichend war. Die bei der MOS 26 Kulturzelle durchgeführte Zellmedienüberstandsuntersuchung blieb ohne nachweisbare Proteine.

Im korrespondierenden Zelllysate fand sich ein SIS-spezifisches Protein von 25 kd.

C Ergebnisse der "Northern Blot"- und Zellmedienüberstandsuntersuchung bei negativer c-SIS-mRNA-Expression im "Dot Blot" und der positiven Expression des SIS-spezifischen Proteins p27.

Bei 3 Zelllinien ohne c-SIS mRNA-Expression im "Dot Blot" mit positiver Expression des SIS-spezifischen Proteins p27 blieben die beiden mittels "Northern Blot"-Analyse untersuchten EF und KEL Kulturzellen ohne nachweisbare c-SIS, c-MYC und c-FOS Transkripte. Die FIB III Kulturzelle wurde nicht auf sezernierte Proteine bzw. mittels "Northern Blot"-Analyse auf mRNA untersucht. Die bei der KEL Kulturzelle durchgeführte Zellmedienüberstandsuntersuchung blieb ohne Nachweis spezifischer Proteine im Zellmedienüberstand und im korrespondierenden Zelllysate.

**D Kulturzellen mit negativer c-SIS-mRNA-Expression im
"Dot Blot" und negativer Expression des
SIS-spezifischen Proteins p27**

Hierunter befanden sich die Kulturzellen MOS Mu 20 und MFS 4 beide als Negativ-Kontrolle dienende Fibroblasten. Bei diesen Kulturzellen wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

E Übrige Kulturzellen

Bei den übrigen Kulturzellen wurden zum einen aufgrund negativer bzw. nur fraglich positiver Expression, zum anderen mangels Material oder schlechtem Zellwachstum keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

5. Diskussion

5.1. Erläuterungen zur Expression der SIS, c-MYC und c-FOS Transkripte in den untersuchten Kulturzellen

Die Untersuchungen der SIS, c-MYC und c-FOS mRNA-Expression der verwendeten Kulturzellen, und die mittels Immunpräzipitation durchgeführte Suche nach SIS spezifischen Proteinen insbesondere nach einem Polypeptid der Molekülgröße des transformierenden Proteins des v-SIS Gens p28SIS in den Sarkomkulturzellen bzw. den anderen untersuchten Kulturzellen waren Kernpunkte dieser experimentellen Arbeit. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Abschnitt 4.

Die Transformation SSV-infizierter Zellen, hat ihre Ursache in der Expression des v-SIS Onkogens. Daher ist es naheliegend, daß die c-SIS-Expression an Mechanismen der Induktion bzw. Aufrechterhaltung des tumorösen Zustandes bei nicht SSV infizierten mesenchymalen Tumorzellen beteiligt ist. Die Ergebnisse dieser Studie stehen hiermit im Einklang, da sich tatsächlich sowohl das c-SIS Transkript als auch SIS Proteine bei einer überzeugenden Anzahl mesenchymaler Tumorkulturzellen nachweisen ließ. Bei einigen Kulturzellen konnte zwar nur ein Parameter (das c-SIS Transkript oder SIS spezifische Proteine) nachgewiesen werden, es gab jedoch keine Tumorkulturzelle bei der beide Parameter negativ waren. Umgekehrt war kein c-SIS Transkript oder ein SIS-spezifisches Protein p27, bei den als Negativkontrolle dienenden erwachsenen, menschlichen bzw. tierischen Fibroblasten bzw. der Hepatozellulären Kulturzelle PLC/PRF 5 nachzuweisen.

Aufgrund der fast homologen Nucleotidsequenz des viralen und zellulären SIS-Gens, ist anzunehmen, daß bei der Expression des zellulären c-SIS-Proto-Onkogens ein Protein gebildet wird, welches in Primärstruktur und Molekülgröße dem viralen Precursor p28SIS entspricht.

In den aus pädiatrischem Krankengut stammenden Osteosarkomkulturzellen SAOS 2, TE 85/2, und der Osteosarkomkulturzelle MOS 25 und der Rhabdomyosarkomkulturzelle RD, bei

welchen das c-SIS Transkript von 4,2 kb im "Dot Blot" und in der "Northern Blot"-Analyse nachweisbar war, gleichwie für die Fibrosarkomkulturzelle FIB III und den Kulturzellen HEL, KEL und EF, fand sich bei der Immunpräzipitation mit dem erwähnten SIS-spezifischen Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS) signifikante Mengen eines Polypeptids, daß in seiner Molekülgröße genau dem AMV Markerprotein von 27 kd und somit dem viralen SIS Precursor p28SIS entsprach. Dieses SIS-spezifische Protein wurde als p27 bezeichnet. Bei den SSV-transformierten Positivkontrollzellen fanden sich gleichfalls ein Polypeptid exakt dieser Molekülgröße sowie c-SIS Transkripte.

Es fand sich in der Literatur kein Nachweis für ein derartiges Protein, was vielleicht darauf zurückzuführen ist, daß bei der überwiegenden Anzahl dieser Untersuchungen Anti-PDGF-Immunseren verwendet wurden, welche vermutlich nicht die Spezifität und Sensitivität, des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, nur gegen das C-terminale Ende des PDGF B/SIS Polypeptid gerichteten Antiserums besitzen. So konnte z.B. mit einem zu Beginn der Proteinuntersuchung probeweise eingesetzten PDGF Antiserum (zur Verfügung gestellt von Dr. B. Westermarck) das virale p28SIS in der verwendeten SSV-infizierten Positiv-Kontrollzelle kaum nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auch das bei der Immunpräzipitation der sezernierten SIS-spezifischen Proteine verwendete, gegen den Mittelteil der PDGF-B-Kette gerichtete Kaninchenantiserum (anti-intern/SIS), entsprach in seiner Sensitivität für p28SIS nicht dem C-terminalen Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS). Möglicherweise ist dies durch die Konformation der PDGF-B-Kette bedingt, welche die Bindung an den Mittelteil des Moleküls erschweren könnte.

Im Gegensatz zu (A-B Ketten) PDGF Antiserum ist das Kaninchenantiserum (anti-C-term./SIS), spezifisch für die B-Kette des PDGF. Dies ist insbesondere dadurch gewährleistet, daß sich im C-terminalen Bereich die PDGF-A und B-Kette nicht überlappen. Aufgrund der Spaltungsreifung des v-SIS Precursor Moleküls p28SIS welches für das c-SIS Precursor Molekül ähnlich ablaufen könnte, ist der Nachweis des Polypeptids mittels des anti-C-terminalen Kaninchenantiserums auf die Anfangs- bzw. Zwischenprodukte beschränkt, welche noch im Besitz ihres C-terminalen Endes sind. Es handelt sich somit um das Precursor Molekül bzw. um größere Zwischenprodukte der Spaltungsreifung des SIS Polypeptids (vgl. Einleitung).

Die Immunpräzipitation mit Antiseren ist zwar kein absoluter Beweis für das Vorhandensein eines Proteins; die Spezifität des verwendeten Antiserums, das Auftreten des Polypeptids in Tumorzellen mit spezifischem c-SIS Transkriptnachweis, der fehlende Nachweis in den Negativkontrollzellen und die genaue Übereinstimmung der Molekülgröße des Proteins mit der des viralen v-SIS Precursor Moleküls p28SIS, lassen es jedoch sehr wahrscheinlich erscheinen, daß es sich bei dem bei den Kulturzellen präzipitierten SIS spezifischen Protein p27 um ein dem viralen p28SIS Precursor Molekül homologes, vom zellulären c-SIS Proto-Onkogen kodiertes Molekül handelt. Somit kann in der vorliegenden Arbeit erstmals der Hinweis auf ein vom zellulären c-SIS- Proto-Onkogen kodiertes Precursor Molekül geliefert werden, welches ähnliche Eigenschaften wie das virale Gegenstück in bezug auf seine zellphysio- bzw. pathophysiologische Wirkung und seinen Weg im Zellmetabolismus haben könnte.

Der Nachweis dieses SIS- spezifischen Proteins p27, sowie der quantitative Nachweis des c-SIS Transkripts für viele, und der qualitativ die c-SIS-Expression beweisende Nachweis des c-SIS Transkripts in der Northern-Blot-Analyse bei einigen exemplarisch weiter untersuchten, Tumorkulturzellen mesenchymalen Ursprungs, scheint darüber hinaus zu bestätigen, daß die Expression des c-SIS-Gens für diese Art Tumorzellen wahrscheinlich ein häufiges und vermutlich wichtiges tumorspezifisches Phänomen darstellt, das die untersuchten normalen Kulturzellen aus gesunden mesenchyalem Gewebe des erwachsenen Organismus nicht zeigen. Bestätigende Hinweise hierfür ergaben sich auch aus einer anderen parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Studie, die zeigen konnte, daß das c-SIS-Gen nicht nur in mesenchymalen Tumorkulturzellen in vitro, sondern auch in Sarkombiopsien, direkt nachweisbar ist (Rainer Brachmann ,Dissertation, LMU).

Der fehlende Nachweis der Expression des c-SIS Transkripts weniger Sarkomkulturzellen bei den Untersuchungen steht, neben den theoretischen Möglichkeiten eines technisch nicht genügend sensitiven Nachweises sowie einer von vorneherein nicht vorhandenen oder "herunter" regulierten c-SIS-Gen-Expression, möglicherweise mit jüngsten Beobachtungen in Beziehung (Betsholz et al., 1986). Diese zeigen, daß bei einigen Sarkomkulturzellen zwar das Transkript des Gens für die PDGF-A-Kette, nicht aber das Transkript des c-SIS-Gens, also der PDGF-B-Kette, und umgekehrt bei anderen Sarkomkulturzellen die Expression des c-SIS-Transkripts nicht aber das Transkript es PDGF-A-Ketten-Gens vorkommt. Der Fall, daß beide Ketten gleichzeitig exprimiert werden, wurde jedoch auch beschrieben.

Bei den etablierten HT 1080 und RD Zelllinien ergaben sich in Hinblick hierauf

erwähnenswerte Ergebnisse bei der c-SIS Expressionsanalyse. Beide Kulturzellen zeigen zu Beginn der Expressionsuntersuchungen im "Dot Blot" C-SIS-Expression. Bei der "Northern Blot"-Analyse konnte in der RNA Präparation der RD Kulturzellen der Nachweis des 4,2 kb c-SIS Transkripts erbracht werden. Bei der HT 1080 Kulturzelle fand sich kein c-SIS-Transkript in der "Northern Blot"-Analyse. Das Vorhandensein von intakter Gesamt-mRNA bei der Untersuchung der HT 1080 Kulturzelle, konnte jedoch durch den Nachweis des c-MYC und c-FOS Transkripts bestätigt werden.

Die in der Literatur beschriebenen SIS-Expressionsuntersuchungen für die RD (Betsholz et al., 1986) und HT 1080 (Pantazis et al., 1985) Zelllinien zeigen für die Untersuchung der HT 1080 Zelllinie das Vorhandensein eines 4,2 kb c-SIS Transkript.

Für die RD Zelllinie beschreibt Betsholz et al., (1986) die Expression des Transkripts der PDGF-A-Kette, nicht aber die des PDGF-B-Ketten (c-SIS) Transkripts. Dies steht im Gegensatz zum Nachweis des c-SIS Transkripts von 4,2 kb, bei der mRNA Präparation der RD Kulturzelle in der "Northern Blot"-Analyse dieser Arbeit (vgl. 3.3.2.). Ferner konnte bei der RD Kulturzelllinie das c-SIS-Transkript im "Dot Blot", und das SIS-spezifische Protein p27 beobachtet werden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der c-SIS Expression für RD und HT 1080 im Vergleich mit der in der Literatur beschriebenen Expression des c-SIS Transkripts dieser Kulturzellen läßt sich möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlich langer Zellpassagen und Zelldichte vor der Lyse der untersuchten Kulturzellen erklären. Ferner ist nicht auszuschließen, daß die in dieser Studie verwendeten Chargen der Kulturzellen und die in der Literatur beschriebenen sich prinzipiell in ihrer Genexpression unterscheiden.

Auch zu Beginn dieser Studie konnte aus einer bestimmten Charge tiefgekühlter RD Kulturzellen nur Zellen aufgezüchtet werden, deren Präparation zwar eine intakte mRNA mit vorhandenem c-MYC Transkript aufwies, bei der jedoch das c-SIS Transkript nicht nachzuweisen war.

Eine andere Erklärung wäre die Möglichkeit, daß es sich bei der Expression des c-SIS-Gens in Bindegewebstumoren nicht unbedingt um eine konstante, vom Zellzyklus unabhängige Expression handelt, sondern das eine vom Zellzyklus abhängige Expression der c-SIS Genprodukte mit regulierten Pegeln stattfindet. Man könnte spekulieren, daß sich die

Expression der A und B Kette gegenseitig möglicherweise über eine Art Rückkopplungsmechanismus beeinflusst. Eine Bestätigung hierfür ließe sich allerdings nur durch Hybridisierungsuntersuchungen mit einer A-Ketten Probe erbringen, welche zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Studie nicht zur Verfügung stand. Gegen diese Vermutung spricht jedoch, daß es Bindegewebstumore gibt, die zum Teil beide Gene gleichzeitig exprimieren (Betsholz et al., 1986).

Neben den Tumorkulturzellen mesenchymalen Ursprungs als Beispiele für malignes neoplastisches Wachstum wurde noch die c-SIS Expression von nicht tumorösen Kulturzellen wie embryonalen Fibroblasten, Narbenkeloidzellen und eine Kulturzelle mit bestimmten megacaryocytären Eigenschaften (HEL) untersucht. Ob die c-SIS Proto-Onkogen Expression für die Proliferation mesenchymaler Zellen in der Embryonalentwicklung und das Wachstum des Narbenkeloidgewebes verantwortlich ist, läßt sich zwar durch die Untersuchungen dieser Arbeit noch nicht aussagen, das Ergebnis der SIS-Proteinexpressionsuntersuchung gibt jedoch einen Hinweis auf eine solche Möglichkeit.

Für embryonale Fibroblasten ist die Sezernierung von Polypeptiden beschrieben, die in ihrer mitogenen Wirkung PDGF entsprechen (Clemmons et al.1983). Bei den embryonalen Fibroblasten EF und der Narbenkeloidkulturzelle KEL fand sich zwar in der "Northern Blot"-Analyse sowie im "Dot Blot" trotz ausreichende Mengen mRNA signalisierender Aktin Hybridisierung kein c-SIS Transkript; für beide Kulturzellen fanden sich aber signifikante Mengen des SIS-spezifischen Proteins p27. Die fehlende Expression des Transkripts steht im auffälligen Kontrast zu dem signifikanten Auftreten des c-SIS-Transkripts bei den Sarkomkulturzellen. Somit ist es möglich, daß einerseits, eine Expression des c-SIS Transkripts vorliegt, die sich mangels einer ausreichenden Konzentration des c-SIS Transkripts dem Nachweis entzieht und das Protein p27 als Translationsprodukt in den Zellen kumuliert und / oder andererseits, die Transkription des c-SIS Gens schwankt und somit zum Zeitpunkt der RNA-Untersuchung durch einen möglichen raschen Abbau der zellulären mRNA keine c-SIS mRNA mehr vorhanden war, wodurch nur die stabileren Proteinprodukte nachweisbar waren. Die Schwankungen der c-SIS Expression ließe sich hierbei durch eine Regulation der Transkription des c-SIS Gens erklären.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß endotheliale Zellen selbst bei fehlender Proteinsynthese zur verstärkten Sekretion von PDGF artigen Proteinen stimuliert werden können (Harlan et al.,1986). Voraussetzung hierfür mußte die Existenz einer Speicherform von PDGF,

vermutlich in Form eines membranassoziierten, inaktiven Precursor Moleküls, sein. In SSV transformierten Zellen sind PDGF bzw. v-SIS Proteine zum Großteil membrangebunden (Thiel and Hafenrichter., 1984 , Robbins et al., 1985). Es ist daher denkbar, daß es sich bei dem SIS-spez. Protein p27 um ein membranassoziiertes Precursorprotein und somit möglicherweise um eine Speicherform der PDGF B-Kette handelt.

Bei den beiden nicht transformierten mesenchymalen Kulturzelllinien EF und KEL finden sich ja nennenswerte Mengen des Proteins (vgl. 3.3.2.), ohne nachweisbares c-SIS-Transkript. Vielleicht liegt hier p27 als eine solche Speicherform vor. Von p27 würden für den Proteinnachweis ausreichende Mengen des Proteins vorhanden sein, während hingegen das c-SIS-Transkript in einer für einen Nachweis zu geringen Konzentration vorliegen könnte. Im Gegesatz hierzu ist bei einigen Sarkomkulturzellen sowohl p27 als auch das c-SIS-Transkript, letzteres als Indikator für die Produktion von SIS Proteinen, nachweisbar. Da die Proteinbande bei diesen Sarkomkulturzellen hierbei zumeist nicht so ausgeprägt war, könnte man annehmen, daß die Sekretion von PDGF ohne eine zwischengeschaltete Speicherung erfolgt. Es wäre daher denkbar, daß bei der Speicherung der PDGF B-Kette ein Unterschied zwischen physiologischen und transformierten Zellen besteht.

Von besonderem Interesse im Hinblick auf die vermutete Bildung des in den Granula der Thrombozyten gespeicherten PGDFs in Megacaryocyten sowie auf p27 als eine mögliche Speicherform der PDGF B-Kette sind die Ergebnisse der Untersuchungen mit der Kulturzelle HEL, die einige megacaryocytaire Marker aufweist. Diese Kulturzelle kann daher möglicherweise Hinweise auf den physiologischen PDGF Syntheseprozess liefern. Da sie einer Erythroleukämie entstammt, besitzt sie erythrocytaire Eigenschaften, wie z.B. das intrazelluläre Vorkommen von Hämoglobin. Sie entspricht somit nicht unbedingt in ihren Eigenschaften einem Megacaryocyten in vivo (Tabilio et al., 1984). Bei den spezifischen Plättchen bzw. Megacaryocytenmarker der HEL Kulturzelle handelt es sich um die Rezeptormembran Glycoproteine GP: Ib, IIb, IIIa, sowie um das Vorkommen von morphologisch den thrombocytairen α Granula stark ähnelnden Granula mit den damit korrelierten Faktoren PF 4 und den von Willebrand Faktor (Tabilio et al., 1984). Die differenzierte HEL Kulturzelle besitzt als einzige bisher beschriebene Kulturzelle diese Eigenschaften. Es ist daher möglich, daß zwischen Megacaryocyten in vivo und der HEL Kulturzelle eine starke Homologie im Zellmetabolismus, respektive der vermuteten c-SIS Gen Expression besteht.

Beweisend für die megacaryocytaire PDGF Produktion wäre letzten Endes allerdings nur die

Untersuchung isolierter menschlicher Megacaryocyten, was aufgrund der geringen Anzahl menschlicher Megacaryocyten im Blut und Knochenmark, sowie deren Reinigung und der Analyse ihrer Transkripte äußerst schwierig sein dürfte (Tabilio et al., 1984). Thrombozyten sind mangels Nucleus bzw. einer effektiven Proteinsynthese für derartige Untersuchungen nicht verwendbar. Die HEL Kulturzelle ist demgegenüber als leicht zu vermehrende Kulturzelle als Studienobjekt megacaryocyitärer Eigenschaften gut geeignet.

Im "Dot Blot" zeigt sich bei der HEL Kulturzelle die Expression des c-SIS Transkripts. Auch in der folgend durchgeführten Proteinuntersuchung fanden sich signifikante Mengen des SIS-spezifischen Proteins p27. In den beiden durchgeführten RNA-Präparationen für die "Northern Blot"-Analyse ließ sich jedoch das 4,2 kb c-SIS Transkript nicht nachweisen, es fand sich aber interessanterweise ein überaus stark exprimiertes MYC Transkript, als möglicher Hinweis auf eine starke proliferative Tendenz dieser Zelle. Bei der HEL Kulturzelle läßt sich das Vorhandensein signifikanter Mengen des SIS-spezifischen Proteins p27, erkennbar an der stark ausgeprägten Proteinbande bei 27 kd (vgl.3.4.2.), bei fehlendem c-SIS Transkriptnachweis in der "Northern Blot"-Analyse, möglicherweise durch unter der Nachweisgrenze liegende Konzentrationen des c-SIS Transkripts erklären. Dies könnte durch eine von vorneherein niedrige Expression des c-SIS Gens oder / und durch einen raschen Abbau der mRNA bei Zellregulationsmechanismen auf RNA Ebene mit Kumulation bzw. Persistenz des Proteinprodukts bedingt sein. Der positive Nachweis des c-SIS Transkripts für die HEL Kulturzelle im "Dot Blot" mag durch eine möglicherweise größere Sensitivität dieses Ansatzes oder durch eine größere Anzahl sich differenzierender oder differenzierter HEL Kulturzellen zum Zeitpunkt dieser anfänglichen Untersuchung bedingt sein. Durch die stets gleichen Kulturmedienbedingungen bei der Zellzucht erscheint dies jedoch eher unwahrscheinlich. Die Ergebnisse bei dieser Kulturzelllinie weisen ebenfalls darauf hin, daß es sich bei dem SIS- spez. Protein p27 um eine Speicherform für die PDGF B-Kette handeln könnte (siehe 4.2.). Hierfür spricht insbesondere, daß für Megakaryocyten die Notwendigkeit besteht PDGF zu speichern, da die aus den Megacaryocyten hervorgehenden Thrombozyten PDGF sezernieren können, obwohl sie nur bedingt zur Synthese des Faktors in der Lage sind.

Die geringe Transkription mit Kumulation bzw. Speicherung des SIS-spezifischen Proteins p27, könnte sich daraus ergeben, daß die bei der HEL Kulturzelle durchgeführten RNA- und Proteinuntersuchungen ohne ausgesprochene Induktoren der Zelldifferenzierung im Kulturmedium der HEL Kulturzelle durchgeführt wurden, da möglichst gleiche

Wachstumsbedingungen für alle Untersuchten Kulturzellen angestrebt wurden.

Jüngeren Ergebnissen zufolge besitzen Monozyten / Makrophagen ebenfalls megacaryocytaire Marker, die sich auch bei der HEL Kulturzelle finden (Tabilio et al., 1984). Als Zellen myeloischen Ursprungs mögen Megacaryocyten und Monozyten als eine gemeinsame Eigenschaft die Produktion von PDGF besitzen. Weitere Untersuchungen müssen dabei zeigen, ob sich die Zusammensetzung des von diesen Zellen gebildeten PDGFs hinsichtlich seiner Untereinheiten wie der PDGF A bzw. B-Kette unterscheidet, da sich hieraus mögliche funktionelle Unterschiede dieser wachstumsstimulierenden Substanz ergeben.

Unterschiede sind aber auch für die SIS/PDGF B-Ketten Proteinprodukte bezüglich ihres Reifungsprozesses bei verschiedenen Zellarten denkbar. Für das virale v-SIS Precursor Protein p28SIS ist die intrazelluläre Proteinspaltungsreifung zum Teil beschrieben (Robbins et al., 1985). Eine Beschreibung mit Schema hierzu findet sich in I.2.

Die Übereinstimmung der Molekülgröße Proteins p27 mit p28SIS in den Kulturzellen lieferte den Hinweis, daß möglicherweise bei der c-SIS Spaltungsreifung ein Glycosilierungsschritt vom Primärprotein zum Glycoprotein ähnlich der v-SIS Spaltungsreifung abläuft. Dies scheint unabhängig von der Zellart zu sei, da bei den untersuchten, bezüglich ihrer Eigenschaften und Herkunft z.t. sehr verschiedenen Kulturzellen signifikante Mengen des SIS-spezifischen Proteins p27 nachweisbar waren.

Für ein im Rahmen der Spaltungsreifung des viralen p28SIS beschriebenen (Robbins et al., 1985) mit anti-C-terminalen SIS Kaninchenimmunsere nachweisbarem SIS Monomer von 20 kd, fanden sich lediglich bei der SSV-transformierten Positivkontrollzelle SSV/SSAV, bei der Fibrosarkomkulturzelle FIB III und bei der Rhabdomyosarkomkulturzelle RD Banden dieser Molekülgröße.

Der fehlende Nachweis dieses Polypeptids bei den anderen p27 Proteinpositiven Kulturzellen ist möglicherweise durch unterschiedlich lange Halbwertszeiten der intrazellulären Spaltungsreifung verursacht. Neben dem SIS-spezifischen Protein p27 fand sich ein weiteres Protein von 25 kd, welches wegen seines zum Teil signifikanten Auftretens bei der überwiegenden Zahl der mesenchymalen Zellen, sowohl der SSV-transformierten, der Sarkomkulturzelle, der Narbenkeloidkulturzelle und auch der Negativkontrollzelle (menschliche Fibroblasten / MOS Mu 20) auffiel. Dieses Polypeptid konnte bei der megacaryocytären HEL Kulturzelle und der PLC/PRF 5 Hepatozellulären Negativ-Kontrollzelle nicht nachgewiesen werden. Es erhebt sich die Frage, ob es sich bei diesem

Polypeptid um ein unspezifisches zelluläres, oder aber um ein spezifisches Protein der c-SIS-Gen-Expression handelt. Es hätte im Rahmen dieser Arbeit zu weit geführt, ein solches Protein zu identifizieren bzw. dessen Rolle im Zellmetabolismus zu verifizieren. Prinzipiell läßt sich daher nicht ausschließen, daß es sich bei dem Protein von 25 kd um ein c-SIS-Gen Produkt handelt, da es beispielsweise im Molekülgrößenbereich des nicht glycosilierten Primärprodukts der v-SIS Spaltungsreifung liegt, welches eine Molekülgröße von 26 kd aufweist (Robbins et al., 1985). Für die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung des SIS Antiserums an zellulären Strukturen welche eine ähnliche Antigenität besitzen wie das C-terminale Ende des p28SIS Polypeptid bzw. die PDGF-B-Kette, spricht jedoch, daß auch in den gesunden Kontrollfibroblasten wie MOS Mu 20 ein solches Protein nachweisbar war. Ferner fand sich keine offensichtliche Korrelation des Auftretens des Proteins mit der gleichzeitigen Expression des c-SIS Transkripts bzw. der des Proteins p27. Um unspezifische zelluläre Proteine dürfte es sich ebenfalls bei den Proteinbanden von 22 - 34 kd handeln, da diese Banden nur vereinzelt und ohne signifikante Häufung auftraten und sich somit einer Zuordnung bezüglich des Auftretens des SIS Transkripts, des Polypeptids p27 und der Charakteristik der Kulturzellen entzogen. Kleinere Proteine als 20 kb, soweit vorhanden, waren aufgrund der Eigenschaften der verwendeten Polyacrylamidgele und der mangelnden Spezifität des Kaninchenantiserums (anti-C-term./SIS) für kleine SIS Peptide ohne C-terminales Ende nicht beurteilbar. Größere spezifische Proteine als 34 kb waren nicht nachweisbar oder konnten im Bereich der Molekülgröße der schweren Ketten der Antikörper des verwendeten Antiserums nicht beurteilt werden.

Im Hinblick auf einen autokrinen Mechanismus für c-SIS Gen exprimierende Tumorzellen und auch anderen Kulturzellen ist es neben dem Nachweis zellassoziierter Proteine von Bedeutung, zu untersuchen, ob sich in den Kulturmedien dieser Zellen SIS-spezifische Proteine nachweisen lassen. Dies kann u.a. einen Hinweis darauf liefern, ob die c-SIS bzw. PDGF-B-Kettenproteine in intrazellulären Bereichen, wie Zellmembranen, Cytosol oder Nucleus, ihre Wirkung entfalten, oder ob sich durch Sekretion die Wirkung dieser Proteine an der äußeren Zellmembran durch Bindung an spezifische Rezeptoren entfaltet. Nachdem diese Arbeit zeigen konnte, daß zellassozierte, SIS-spezifische Proteine wie p27 in Sarkomkulturzellen und auch in anderen Kulturzellen vorkommt, sollte gleichfalls untersucht werden, ob Kulturzellen mit der Expression dieses Polypeptids gleichfalls SIS-spezifische Proteine in ihr Kulturmedium sezernieren.

In SSV-transformierten Zellen finden sich die SIS-spezifischen Proteine nur zum geringen Teil im Zellkulturmedium. Zum Großteil finden sie sich an zelluläre Membranen gebunden (Robbins et al., 1985). Die bisher beschriebenen sezernierten v-SIS-spezifischen Proteine haben unter reduzierenden Bedingungen eine Größe von 11 und 13 kd (Johnsson A. et al., 1985b). Aktivierte Makrophagen / Monozyten sezernieren c-SIS spezifische Proteine, welche mit PDGF Antiseren als Polypeptide von gleichfalls 11 - 13 kd präzipitiert werden (Shimokado et al., 1985). Es fanden sich in den Zellkulturmedien der 6 untersuchten Kulturzellen bei den beiden Osteosarkomkulturzellen SAOS2 und TE 85/2 SIS-spezifische Proteine von 13 kd (Abb. 10 Spur D) und ca (22), 24 kd.

Die zu den Zellkulturmedien korrespondierenden Zelllysate zeigen bei SAOS/2 und TE85/2 Proteine von Molekulargewichten zwischen 11 - 28 kd. Da unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde, handelt es sich um Monomere. Bei dem sezernierten Protein von 13 kd könnte es sich um das in der Literatur beschriebene sezernierte SIS Protein von 13 kd handeln. Dies würde zeigen, daß Osteosarkomkulturzellen mit c-SIS-Gen-Expression auch Proteinprodukte der c-SIS-Gen-Expression in ihr extrazelluläres Medium entlassen. An SIS-spezifischen Proteinen im Zelllysat kam bei beiden Kulturzellen wiederum das Polypeptid von 13 kd zur Präzipitation, welches dem sezernierten Protein dieser Molekülgröße homolog sein dürfte. Der fehlende Nachweis Proteins p27 im Zelllysat ist vermutlich auf die schwache Sensitivität des verwendeten Antiserums für dieses Protein zurückzuführen. Bei SAOS 2 besteht jedoch die Möglichkeit, daß es sich bei dem Protein von 28 kd um p 27 SIS handelt. Bei SAOS 2 war gleichfalls der Nachweis eines Proteins von 11 kd interessant, welches allerdings nur im Zelllysat und somit als intrazelluläres und nicht sezerniertes Protein in Erscheinung trat. Dieses Protein könnte mit dem in der Literatur beschriebenen kleinen SIS Monomer von 11,5 kd identisch sein.

Die Stellung der im Zellkulturmedium von TE 85/2 und SAOS 2 präzipitierten Proteine von 22 und 24 kd, sowie der übrigen Proteine des Zelllysats, lassen sich bezüglich ihrer SIS-Spezifität nicht sicher beurteilen. Das verwendete Kaninchenantiserum (anti-intern/SIS) ist gegen eine Region der PDGF-B-Kette gerichtet, die in einigen Aminosäuren homolog zur PDGF-A-Kette ist. Da über die Expression der PDGF-A-Kette bei den untersuchten Kulturzellen keine Aussage gemacht werden kann, ist es möglich, daß auch PDGF-A-Kettenprodukte präzipitiert wurden. Bei TE85/2 findet sich im Zelllysat ein Protein von 16 kd, welches mit einem PDGF-A-Ketten Polypeptid von 16 kd (Betsholz et al., 1986)

identisch sein könnte.

Bei den 4 übrigen Kulturzellen NP 1, HEL, KEL und MOS 26 fanden sich keine SIS-spezifischen Proteine in ihren Zellkulturmedien, was für die HEL und MOS 26 Kulturzelle die Vermutung einer fehlenden Sezernierung SIS-spezifischer Proteine bestätigt. Für MOS 26 resultiert diese Vermutung aus der Tatsache, daß diese Kulturzelle zwar im "Dot Blot" SIS Transkript positiv war, sich bei der folgenden Proteinuntersuchung jedoch lediglich signifikante Mengen des erwähnten Proteins von 25 kd fanden, und ferner der Nachweis des c-SIS Transkripts in der "Northern Blot"-Analyse negativ ausfiel.

Daher wurde um nachzuweisen ob es sich bei dem Protein von 25 kd nicht doch um ein SIS Polypeptid handelt bei MOS 26 nach kleinen SIS-spezifischen Polypeptiden im Zelllysat und im Zellkulturmedium gesucht. Es fand sich zwar das SIS- spezifische Protein von 25 kd im Zelllysat, kleinere SIS- spezifische Proteine waren jedoch weder im Zelllysat noch im Zellkulturmedium nachweisbar. Dies liefert weiterhin einen Hinweis darauf, daß es sich bei dem SIS-spezifischen Protein von 25 kd um kein vom c-SIS Gen kodiertes Protein handelt.

Der fehlende Nachweis SIS-spezifischer Proteine sowohl im Zelllysat als auch im Zellkulturmedium bei den NP 1 und KEL Kulturzellen mag in der mangelnden Sensitivität des verwendeten Antiserums (anti-intern/SIS) für das p28sis Protein begründet liegen, wobei zu geringe Konzentrationen dieses Polypeptids bei dieser Immunpräzipitation gleichfalls eine Rolle gespielt haben mögen. Kleinere SIS-spezifische Produkte scheinen von dieser Kulturzelle ebenfalls nicht sezerniert zu werden. Es bleibt abzuwarten, inwieweit PDGF-B-Kettenprodukte bei Tumorzellen über eine Sezernierung eine autokrine Funktion erfüllen, oder ob lediglich die Expression und Sezernierung der PDGF-A-Kette wie von Betsholtz et al.,(1986) vermutet, einen autokrinen Mechanismus unterhält.

Die Untersuchung der sezernierten Proteine hat für 2 Osteosarkomkulturzellen gezeigt, daß diese c-SIS Gen exprimierende Kulturzellen wahrscheinlich auch SIS-spezifische Proteine in ihr Kulturmedium entlassen.

Ein anderer Gegenstand der Untersuchungen war die Frage nach einer Koexpression der Onkogene c-MYC und c-FOS mit dem SIS Onkogen. Beide Onkogene werden durch PDGF zur Expression ihrer Transkripte stimuliert (Kruijer et al., 1984, Cochran et al., 1984, Greenberg et al., 1984, Kelly et al., 1983).

Die Expression dieser Onkogene zeigt einen signifikanten Anstieg und Abfall nach

Stimulation mit PDGF, wobei die c-FOS-Expression zeitlich vor der c-MYC-Expression erfolgt (Müller and Verma 1984). Das c-SIS Transkript findet sich zwar fast regelmäßig in Kulturzellen mit der Expression des c-MYC Transkripts, wie RD, SAOS 2, TE 85/2 und den SSV-transformierten Kontrollzellen, es ist jedoch auffällig, daß in den Kulturzellen wie MOS 26, HT 1080 und HEL die c-MYC-Expression ohne eine gleichzeitige c-SIS-Expression nachweisbar ist. Die Expression des c-MYC Transkripts scheint somit bei den untersuchten Kulturzellen ein nicht direkt mit der c-SIS Gen-Expression der Kulturzellen gekoppeltes Ereignis zu sein. Andererseits fand sich jedoch bei keiner der untersuchten Kulturzellen die Expression des c-SIS Transkripts ohne eine vorhandene c-MYC-Expression. Für das c-MYC Transkript fanden sich insgesamt alle möglichen Konstellationen einer Koexpression mit den beiden anderen Onkogenen. Bei den Kulturzellen MOS 24, MOS 13, EF und KEL fand sich weder die Expression des c-MYC Transkripts noch die der beiden anderen Onkogene, wobei sich nicht mit Bestimmtheit sagen läßt, ob die Menge spezifischer mRNA von MOS 13, EF, KEL für eine Hybridisierung mit der jeweiligen Onkogen Probe ausreichend war.

Für die c-FOS- Proto-Onkogen-Expression fand sich ähnlich wie für die c-MYC Expression kein ursächlicher Zusammenhang mit der Expression des c-SIS Onkogens. Die Expression des c-FOS Transkripts fand sich bei SAOS/2, TE 85/2 in Kombination mit c-SIS und c-MYC Expression (Rainer Brachmann, Dissertation, LMU), bei MOS 26, HT 1080 in Kombination mit c-MYC-Expression. Eine isolierte c-FOS-Expression fand sich im Gegensatz zur c-MYC-Expression in keiner Kulturzelle, das FOS Transkript wurde jeweils nur in Kombination mit dem c-MYC Transkript exprimiert. Ein Zusammenhang kann daraus jedoch nicht gefolgert werden.

Es sollen hier noch einige Anmerkungen zur technischen Ausführung der Experimente, vor allem zur Reinigung und Analyse der RNA, sowie zum Verhalten von Kulturzellen gemacht werden, da hierin vermutlich Erklärungen für einige scheinbar widersprüchliche Ergebnisse der SIS- Protein- und mRNA-Expressionsanalyse bei bestimmten Kulturzellen zu suchen sind. Bei der Interpretation der Ergebnissen der mRNA Expressionsanalyse ist zu beachten, daß bei den mRNA untersuchungen die Gesamte mRNA der Kulturzellen analysiert wurde. Es wurden keine sog. "Run Off" Experimente durchgeführt, die Aufschluß über die Halbwertszeit der spezifischen mRNA in der Zelle geliefert hätten, da zum Zeitpunkt der experimentellen Anfertigung dieser Studie die Ausführung solcher Experimente nur sehr ungenügend bekannt waren, und zum anderen der experimentelle Aufwand im Rahmen

dieser Studie zu groß gewesen wäre. Daher ist es bei einigen Kulturzellen wie EF, KEL und HEL wahrscheinlich, daß sich die spez. mRNA durch ihre Kurzlebigkeit z.B. im Rahmen von RNA- Reifungsprozessen dem Nachweis entzogen haben, während die stabilen Proteinprodukte der Gen-Expression wie p27 in für den Proteinnachweis ausreichenden Mengen vorhanden waren.

Der umgekehrte Fall einer nachweisbaren langlebigen ungereiften c-SIS mRNA, die nicht translatiert wird, daher keine spezifischen Proteinprodukte nachweisbar sind, ist z.B. für die Sarkomkulturzellen MOS 24, MOS 20 und MOS 13 denkbar. Bei diesen Kulturzellen sind jedoch auch andere folgend geschilderte Erklärungen möglich. Hierzu könnten z.B. bestimmte Eigenschaften der beiden mRNA Analysemethoden ("Dot Blot", "Northern Blot"-Analyse) zählen. Grundsätzlich kommt dem "Northern Blot" Verfahren eine höhere Aussagekraft der Analyse spezifischer mRNAs zu als dem "Dot Blot", da bei diesem Verfahren sowohl quantitäts- als auch qualitative Aussagen bezüglich der Molekülgröße einer spezifischen mRNA möglich sind. Falsch negative bzw. positive Ergebnisse durch unspezifische Bindungen einer spezifischen Probe sind bei diesem Verfahren daher größtenteils vermeidbar. Nachteil des Verfahrens sind die vergleichsweise großen Zellmengen, die zur Gewinnung der mRNA nötig sind, wodurch sich bei langsam wachsenden Kulturzellen die Gewinnung von mRNA als schwierig oder unmöglich erweist. Auch die verschiedenen Schritte der Aufarbeitung der mRNA bis zu ihrer Bindung an den Nitrocellulosefilter gestalten sich durch die fragile Natur der RNA bezüglich ihrer Gefährdung durch den Abbau durch RNAsen als schwierig. Die gesuchte mRNA kann degradiert werden und sich hierdurch weitgehend dem Nachweis entziehen. Anders die Analyse einer spezifischen mRNA mittels "Dot-Blot". Als schnell durchzuführendes Screening-Verfahren besitzt diese Methode eine vergleichsweise hohe Sensitivität. Die Gefährdung der mRNA ist durch die relativ kurze Analysezeit ebenfalls gering. Auch sind die erforderlichen Zellmengen bei weitem nicht so groß wie die für die "Northern Blot"-Analyse. Als Nachteil erweist sich die zwar geringe aber dennoch vorhandene Verunreinigung der an den Nitrocellulosefilter gebundenen mRNA durch Proteine bzw. DNA. Dies kann zu unspezifischen Bindungen und damit zu falsch positiven Ergebnissen führen, zumal die Verifizierung eines Ergebnisses durch Bestimmung der Molekülgröße wie bei der "Northern Blot"-Analyse nicht möglich ist. Es ist daher denkbar, daß das c-SIS-Gen bei Kulturzellen wie MOS 24, MOS 20 und MOS 13 von vorneherein nicht exprimiert wird, so daß falsch positive Ergebnisse im "Dot Blot" zu widersprüchlichen Ergebnissen der Protein- bzw. "Northern Blot" mRNA-Analyse der Kulturzellen führen. In vitro gezüchtete Kulturzellen können zwar nur Modelle für die in vivo ablaufenden

zellphysio- bzw. pathophysiologischen Vorgänge höherer Organismen liefern. So ist beispielsweise bei den Ergebnissen der RNA-Untersuchungen zu berücksichtigen, daß sich die einzelnen Zellen der Monolayerkulturen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befanden und daher nicht beurteilt werden kann, ob die c-SIS-Expression zellzyklusabhängig oder konstant erfolgt. Es ist außerdem denkbar, daß Kulturzellen nach ihrer Etablierung als Zelllinie im Laufe der Zeit Veränderungen durchmachen, und damit nicht mehr dem Zustand der Zelle im Ursprungsgewebe entsprechen. Dies wären z.B. Veränderungen, die mit der Induktion der Expression in vivo ruhender Gene einhergehen und die durch die Wachstumsfaktoren der in den Zellkulturmedien von Kulturzellen enthaltenen Tierseren ausgelöst sein könnten.

Der Nachweis signifikanter Mengen des c-SIS-Transkripts in mehreren Tumorbiopsien menschlicher Sarkome (Rainer Brachmann, Dissertation, LMU), als eine Art Momentaufnahme eines mesenchymalen Tumors in unterstützt stark die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene c-SIS-Expression in Sarkomkulturzellen. Eine in vitro induzierte Expression dieses Onkogens für diese Kulturzellen ist daher nicht sehr wahrscheinlich, zumal bei den untersuchten aus gesundem Gewebe isolierten normalen erwachsenen Fibroblasten der Nachweis des c-SIS-Transkripts nicht erbracht werden konnte.

Abschließend sei noch erwähnt, daß in der erwähnten Parallelstudie (Rainer Brachmann, Dissertation, LMU) bei den dort untersuchten Kulturzellen und Sarkombiopsien, kein Anhalt für eine Translokation bzw. die Amplifikation des c-SIS Gens im Genom der betreffenden Kulturzellen und Biopsien zu finden war.

Ogleich die bis heute gewonnenen Einblicke in die Rolle des c-SIS Proto-Onkogens, seiner Proteinprodukte und auch der der anderen Onkogene, bereits interessante Aspekte im Hinblick auf Erklärungen zur Entstehung maligner Neoplasien geliefert haben und darüberhinaus auch mögliche diagnostische oder gar therapeutische Möglichkeiten erhoffen lassen, ist man noch weit von einem endgültigen Verständnis insbesondere der kausalen Zusammenhänge der Mechanismen des neoplastischen Tumorwachstums entfernt. Für das Verständnis der Stellung des c-SIS Gens im Rahmen dieser Zusammenhänge sind daher Studien bezüglich des Vorkommens und der Funktion der Transkripte, der Proteinprodukte und des Bezuges zu anderen Onkogenen notwendig. Die Ergebnisse dieser Studie mögen einen Beitrag hierzu leisten.

6. Zusammenfassung

Die B-Kette des Platelet derived growth Factors (PDGF) wird von der Gensequenz des zellulären c-SIS-Proto-Onkogen kodiert. Als potentes Mitogen regt es mesenchymale Zellen zur Proliferation an, was Teil der Wundheilung bzw. Narbenbildung ist. Das c-SIS Proto Onkogenprodukt ist also nicht per se onkogen. Das dem c-SIS Proteinprodukt homologe virale v-SIS Proteinprodukt p28SIS wirkt bei mesenchymalen Zellen sicher transformierend. In Bindegewebstumoren fand man c-SIS Transkripte, was zur Vermutung führte, daß auch die Expression des c-SIS-Proto-Onkogens an der Transformation mesenchymaler Zellen zu malignen Tumoren beteiligt sein könnte.

Da bisher nur für einige exemplarisch untersuchte Sarkomkulturzellen c-SIS Expression beschrieben ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine größere Anzahl dieser Sarkomkulturzellen auf c-SIS Gen Expression auf RNA und Proteinebene untersucht. In mehreren dieser Tumorkulturzellen mesenchymalen Ursprungs fand sich die Expression der c-SIS mRNA. Ein SIS-spezifisches Protein von 27 kd (p27) war gleichfalls nachweisbar. Bei diesem vermutlich vom c-SIS Proto-Onkogen kodierten Protein könnte es sich um ein dem viralen p28SIS Precursor homologes zelluläres Molekül handeln.

Im Hinblick auf einen autokrinen Mechanismus des Tumorzellwachstums wurde in den Zellkulturmedien exemplarisch ausgewählter Kulturzellen nach sezernierten SIS-spezifischen Proteinen gefahndet. Bei zwei Osteosarkomkulturzellen fanden sich im Zellkulturmedium SIS-spezifische Proteine.

Da PDGF in Fibroblastenkulturzellen die Expression der c-MYC und c-FOS Onkogene induziert, besteht möglicherweise ein Zusammenspiel dieser Proto-Onkogene mit dem c-SIS-Proto-Onkogen. Daher wurden einige exemplarisch ausgewählte Kulturzellen auf die Koexpression dieser drei Onkogene untersucht. Häufig fand sich hierbei die Expression des c-MYC, vereinzelt die des c-FOS Onkogens. Bezüglich der Wertigkeit dieses Ergebnisses im Hinblick auf ein Zusammenspiel der Gen-Expression der drei Onkogene lassen sich jedoch keine Aussagen machen.

Neben den Tumorkulturzellen wurden drei andere Kulturzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen histogenetischen Herkunft gleichfalls auf c-SIS Expression untersucht. Um Hinweise auf die Bildung des thrombocyitären PDGFs in Megacaryocyten zu erhalten, wurde eine Kulturzelle mit bestimmten megacaryocyitären Eigenschaften auf c-SIS Expression untersucht. Es fand sich ebenfalls das SIS-spezifische Protein p27, welches in dieser Form in Zellen gespeichert sein könnte. Es fand sich bei der HEL Kulturzelle jedoch kein überzeugender Nachweis des c-SIS Transkripts was jedoch vermutlich auf eine nur geringe Transkription des c-SIS Proto Onkogens oder Kurzlebigkeit der c-SIS mRNA bei dieser Kulturzelllinie zurückzuführen ist.

Um die Frage zu beantworten, ob die c-SIS-Gen-Expression mit der proliferativen Tendenz von embryonalem mesenchymalem Gewebes und dem Wachstum des Narbenkeloidgewebes korreliert ist, wurden embryonale Fibroblastenkulturzellen und Narbenkeloidkulturzellen ebenfalls auf c-SIS-Proto-Onkogen Expression untersucht. Auch hierbei fand sich das SIS-spezifische Protein p27. Bei diesen Kulturzellen wurde kein c-SIS Transkript nachgewiesen. Möglicherweise kumuliert auch bei diesen Zellen das Protein p27 während sich das Transkript ähnlich der HEL Kulturzelle aufgrund seiner niedrigen Konzentration oder durch seinen schnellen Abbau in der Zelle nicht nachweisen läßt.

6. Literaturverzeichnis:

- Aaronson, S.A. (1973): Biologic characterization of mammalian cells transformed by a primate sarcoma virus. *Virology*, 52, 562-567.
- 33 Abrams, HD, Rohrschneider, LR, Eisenman, RN (1982): Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. *Cell* 29:427.
- Adamson, E.D., Meek, J. and Edwards, A.A. (1985): Product of the cellular oncogene, c-fos, observed in mouse and human tissues using an antibody to a synthetic peptide. *EMBO J.*, 4, 941-947.
- Antonlades, H.N., Scher, C.D. and Stiles, C.D. (1979): Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 1809-1813.
- Antonlades, H.N. (1981): Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78, 7314-7317.
- Armella, H.A., Armella, M. C.S., Kelly, K., Stewart, T., Leder, P., Cochran, B.H. and Stiles, C.D. (1984): Functional role for c- myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature*, 310, 655-660.
- Barker, P.E., Rabin, M., Watson, M., Breg, W.R. and Ruddle, F.H. (1984): Human c- fos oncogene mapped within chromosomal region 14q21-q31. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5826-5830.
- Barrett, T.B., Gajdusek, C.M., Schwartz, S.M., McDougall, J.K. and Benditt, E.P. (1984): Expression of the sis gene by endothelial cells in culture and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6772-6774.
- Bergholz, C.M., Wolfe, L.G. and Deinhardt, F. (1977): Establishment of simian sarcoma virus type 1 (SSV-1)-trans-formed nonproducer marmoset cell lines. *Int. J. Cancer*, 20, 104-111.
- Berk, B.C., Alexander, R.W., Brock, T.A., Gimbrone, M.A. and Webb, R.C. (1986): Vasoconstriction: A new activity for platelet-derived growth factor. *Science*, 232, 87-90.
- Betsholtz, C., Heldin, C.-H., Nister, M., Ek, B., Wasteson, A. and Westermark, B. (1983): Synthesis of a PDGF-like growth factor in human glioma and sarcoma cells suggests the expression of the cellular homologue to the transforming protein of simian sarcoma virus. *Biochem. And Biophys. Res. Comm.*, 117, 176-182.
- Betsholtz, C., Westermark, B., Ek, B. and Heldin, C.-H. (1984): Coexpression of a PDGF-like factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: implications for autocrine receptor activation. *Cell* 39, 447-457.
- Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.-H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M.S., Eddy, R., Shows, T.B., Philpott, K., Mellor, A. L., Knott, T.J. and Scott, J. (1986): cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 320, 695-699.

Bishop, J.M. and Varmus, H.E. (1982): Functions and origins of retroviral transforming genes. In: Weiss, R. et al. (ed), *Molecular biology of tumor viruses*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 999-1108.

Bishop, J.M. (1983a): Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 301-354.

Bishop, J.M. (1983b): Cancer genes come of age. *Cell*, 32, 1018-1020.

Blick, M., Westin, E., Guttermann, J., Wong-Staal, F., Gallo, R., McCredle, K., Keating and M., Murphy, E. (1984): Oncogene expression in human leukemia. *Blood*, 64, 1234-1239.

Bowen-Pope, D.F., Vogel, A., and Ross, R. (1984b): Production of platelet-derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2396-2400.

Bresser, J., Doering, J. and Gillespie, D (1983a): Selective mRNA or DNA immobilization from whole cells. *DNA*. 2(3): 243-254.

Bresser, J. and Gillespie, D (1983): Quantitative binding of covalently closed circular DNA to nitrocellulose in NaI. *Anal. Biochem.* 129:357-364.

Bresser, J., Hubbell, H and Gillespie, D. (1983b): Biological activity of mRNA. Immobilized on nitrocellulose in NaI. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80(21): 6523-6527.

Campisi, J., Gray, H.E., Pardee, A.B., Dean, M., and Somensheim, G.E. (1984): Cell-cycle Control of c- myc but not c- ras Expression is lost following chemical Transformation. *Cell* 36, 241-247.

Clarke, M.F., Westin, E., Schmidt, D., Josephs, S.F., Ratner, L., Wong-Staal, F., Gallo, R. and Reltz, M.S., Jr.(1984) :Transformation of NIH 3T3 cells by a human c-sis cDNA clone. *Nature*, 308, 464-467.

Clemmons, D.K, (1983): Age Dependent Production of a Competence Factor by Human Fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 114:61-67.

Cochran, B.H., Zullo, J., Verma, J.M. and Stiles, C.D. (1984): Expression of the c- fos gene and of a fos -related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science*, 226, 1080-1082.

Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C., and Chinkers, M. (1982): A native 170.000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J.Biol. Chem.* 257, 1523-1531.

Cooper, G.M. (1982): Cellular transforming genes. *Science*, 218, 801-806.

Cooper, J.A., Bowen-Pope, D.F., Ralnes, E., Ross, R. and Hunter, T. (1982b): Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* 31, 263-273.

Croce, C.M., Erikson, J., Nishikura, K., ar-Rushdi, A., Giallongo, A., Rover, G., Finan, J. and Nowell, P.C. (1984): Chromosomal translocations and c-myc activation in Burkitt's lymphoma. *Cancer Cells 2/Oncogenes and viral genes*, ed. by Vande Woude, G.F. et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 235-242.

Curran, T. and Teich, N.M. (1982a): Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000 dalton phosphoprotein. *J.Virol.*, 42, 114-122.

Curran, T., Peters, G., Van Beveren, D., Teich, N.M. and Verma, I.M. (1982): The FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J. Virol.*, 44, 674-682.

Curran, T., MacConnell, W.P., van Straaten, F. and Verma, I.M. (1983): Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v- fos gene from mouse and human cells. *Mol. Cell. Biol.*, 3, 914-921.

Curran, T., Miller, A.D., Zokas, F.L. and Verma, I.M. (1984): Viral and cellular fos gene products are located in the nucleus. *Cell*, 36, 259-268.

Dalla-Favera, R., Gelmann, E.P., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1982): A human onc gene homologous to the transforming gene (v- sis) of simian sarcoma virus. *Nature*, 292, 31-35.

Dalla-Favera, R., Gallo, R.C., Giallongo, A. and Croce, C.M. (1982b): Chromosomal localization of human homolog (c- sis) of the simian sarcoma virus onc gene. *Science*, 218, 686-688.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C. and Croce, C.M. (1982c): Human c- myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is trans-located in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7824-7827.

Deuel, T.F., Huang, J.S., Proffitt, R.T., Baenziger, J.U., Chang, D. and Kennedy, B.B. (1981): Human platelet-derived growth factor-purification and resolution into two active protein fractions. *J. Biol. Chem.* 256, 8896-8899.

Deuel, T.F., Huang, J.S., Stroobant, P. and Waterfield, M. (1983): Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in simian sarcoma virus transformed cells. *Science* 221, 1348-1350.

Der, C.J., Krontiris, T.G. and Cooper, G.M. (1982): Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras -genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3637-3640.

Devare, S.G., Reddy, E.P., Robbins, K.C., Andersen, P.R., Tronick, S.R. and Aaronson, S.A. (1982): Nucleotide sequence of the transforming gene of simian sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3179-3182.

32, Donner, P., Grelser-Wilke, I., Moelling, K.: Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. *Nature* 296:262, 1982.

Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A. and Antoniades, H.N. (1983): Simian sarcoma virus onc-gene, v- sis, is derived

from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science*, 221, 275-277.

Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scarce, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Waterfield, M.D. (1984): Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521-527.

Duesberg, P.H. (1985): Activated proto-onc genes: sufficient or necessary for cancer?. *Science*, 228, 669-677.

Ekl, B., Westermark, B., Wasteson, A. and Heldin, C.-H. (1982): Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor. *Nature* 295, 419-420.

Eva, A., Robbins, K.C., Andersen, P.R., Srinivasan, A., Tronick, S.R., Reddy, E.P., Ellmore, N.W., Galen, A.T., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Westin, E.H., Wong-Staal, F., Gallo, R.C. and Aaronson, S.A. (1982): Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells. *Nature*, 295, 116-119.

Fabricant, R.N., De Larco, J.E. and Todaro, G.J.: Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 565-569.

Finkel, M.P., Biskis, B.O. and Jinkins, P.B. (1966): Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science*, 151, 698-701.

Finkel, M.P. and Biskis, B.O. (1968): Experimental induction of osteosarcomas. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 10, 72-111.

Fox, P.L. and DiCorleto, P.E. (1984): Regulation of production of a platelet-derived growth factor-like protein by cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 121, 298-308.

Gazit, A., Igarashi, H., Ing-Ming Chiu, Srinivasan, A., Yaniv, A., Tronick, S., Robbins, K.C., and Aaronson, S.A. (1984): Expression of the normal human sis/PDGF-2 coding sequence induces cellular transformation. *Cell*, Vol. 39, 89-97

Glenn, K., Bowen Pope, D.F. and Ross, R. (1982): Platelet-derived growth factor II. Identification of a platelet-derived growth factor receptor by affinity labeling. *J. Biol. Chem.* 257, 5172-5176.

Gonda, T.J., Sheiness, D.K. and Bishop, J.M. (1982): Transcripts from the cellular homolog of retroviral oncogenes: distribution among chicken tissues. *Mol. Cell. Biol.* 2, 617-624.

Gonda, T.J. and Metcalf, D. (1984): Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukemia. *Nature*, 310, 249-251.

Goustin, A.S., Betsholtz, C., Pfeifer-Ohlsson, S., Persson, H., Rydner, J., Bywater, M., Holmgren, G., Heldin, C.-H., Westermark, B. and Ohlsson, R. (1985): Coexpression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. *Cell*, 41, 301-312.

Graf, T. and Beug, H. (1979): Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Acta*, 516, 269-299.

Graves, D.T., Owen, A.J. and Antoniades, H.N. (1983): Evidence that a human osteosarcoma cell line which secretes a mitogen similar to platelet-derived growth factors present in platelet-poor plasma. *Cancer Res.* 43, 83-87.

Graves, D.T., Owen, A.J., Barth, R.K., Tempst, P., Winoto, A., Fors, L. and Hood, L.E. (1984): Detection of c- sis transcripts and synthesis of PDGF-like proteins by human osteosarcoma cells. *Science*, 226, 972-974.

Greenberg, M.E. and Ziff, E.B. (1984): Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c- fos proto-oncogene. *Nature*, 311, 433-438.

Harlan, J.M., Thompson, P.J., Ross, R. and Bowen-Pope, D.F. (1986): -thrombin induces release of PDGF-like molecule(s) by cultured human endothelial cells. *J. Cell. Biol.* 102, in press.

Hayday, A.C., Salto, H., Wood, C., Gillies, S.D. and Tonegawa, S. Wiman, K. and Haywara, W.S. (1984): Activation of c-myc Gene by Translocation in a Human Non-Hodgkin's Lymphoma: Transcriptional and Translational Mechanisms. *Cancer Cells 2 / Onkogens and viral Genes* ed. by Vande Woude, O.F. et al. Cold Spring Harbor Laboratory, 243-252.

Heldin, C.-H., Westermark, B. and Wasteson, A. (1979): Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 3722-3726.

Heldin, C.-H., Westermark, B. and Wasteson, A. (1980): Chemical and biological properties of a growth factor from human cultured osteosarcoma cells: resemblance with platelet-derived growth factor. *J. Cell. Physiol.* 105, 235-246.

Heldin, C.-H., Westermark, B. and Wasteson, A. (1981): Specific receptors for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78, 3664-3668.

Heldin, C.-H., Ek, B. and Rönstrand, L. (1983): Characterization of the receptor for platelet-derived growth factor on human fibroblasts. Demonstration of an intimate relationship with a 185,000 dalton substrate for the platelet-derived growth factor-stimulated kinase. *J. Biol. Chem.* 258, 10054-10061.

Heldin, C.H. and Westermark, B. (1984): Growth factors: Mechanism of action and relation to Oncogenes. *Cell*, Vol.37, 9-20.

Holley, R.W. (1975): Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature*, 258, 487-490.

Huang, J.S., Huang, S.S. and Deuel, T.F. (1983): Human platelet-derived growth factor: radioimmunoassay and discovery of a specific plasma-binding protein. *J. Cell Biol.* 97, 383-388.

Huang, J.S., Huang, S.S. and Deuel, T.F. (1984): Transforming protein of simian sarcoma virus stimulates autocrine growth of SSV-transformed cells through PDGF cell-surface receptors. *Cell* 39, 79-87.

- Hunter, T. (1982): Synthetik peptide substrates for a tyrosine protein kinase. *J. Biol. Chem.* 257, 4843-4848.
- Johnson, L., Jr., Wolfe, L.G., Whisler, W.W., Norton, T., Thakkar, B. and Deinhardt, F. (1975): Induction of gliomas in marmosets by simian sarcoma virus, type 1 (SSV-1). *Asst. Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 16, 119.
- Johnsson, A., Heldin, C.-H., Westermark, B. and Wasteson, A. (1982): Platelet-derived growth factor: identification of constituent polypeptide chains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 66-74.
- Johnsson, A., Heldin, C.-H., Wasteson, A., Westermark, B., Deuel, T.F., Huang, J.S., Seeburg, P.H., Gray, A., Ullrich, A., Scrace, G., Stroobant, P. and Waterfield, D. (1984): The c- sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. *EMBO J.*, 2, 921-928.
- Johnsson, A., Betsholtz, C., Heldin, S.-H. and Westermark, B. (1985a): Antibodies against platelet-derived growth factor inhibit acute transformation by simian sarcoma virus. *Nature*, 317, 438-440.
- Johnsson, A., Betsholtz, C., Von der Helm, K., Heldin, C.-H. and Westermark, B. (1985b): Platelet-derived growth factor agonist activity is exerted by secreted form of the v- sis oncogene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1721-1725.
- Kaplan, D.R., Chao, F.C., Stiles, C.D., Antoniades, H.N. and Scher, C.D. (1979): Platelet alpha-granules contain a growth-factor for fibroblasts. *Blood*, 53, 1043-1052.
- Kasuga, M., Fujita-Yamaguchi, Y., Blithe, D.L., White, M.F. and Kahn, C.R. (1983): Characterization of the insulin receptor kinase purified from human placental membranes. *J. Biol. Chem.* 258, 10973-10980.
- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. and Leder, P. (1983): Cell-specific regulation of the c- myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, 35, 603-610.
- Klein, G. (1983): Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell*, 35, 311-315.
- Kruijer, W., Cooper, J.A., Hunter, T. and Verma, I.M. (1984): Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c- fos gene and protein. *Nature*, 312, 711-716.
- Land, H., Parade, L.F. and Weinberg, R.A. (1983): Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*, 222, 771-778.
- Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdar, A.F., Minna, J.D. (1983): Amplification and expression of c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306, 194-196.
- Maniatis, R., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 109-112.
- Martin + Papayannopoulou, T. (1982): HEL CELLS: A new human Erythroleukemia cell line with spontaneous and induced Globin expression. *Science* 216, 1233-1235.

Martinet, Y., Bitterman, P.B., Mornex, J.-F., Grotendorst, G.R., Martin, G.R. and Crystal, R.G. (1986): Activated human monocytes express the c- sis proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. *Nature*, 319, 158-160.

Marx, J.L. (1984): Oncogene linked to cell regulatory system. *Science*, 226, 527-528.

McCoy, M.S., Toole, J.J., Cunningham, J.M., Chang, E.H., Lowy, D.R. and Weinberg, R.A. (1983): Characterization of a human colon/lung carcinoma oncogene. *Nature*, 302, 79-81.

McAllister, R.M., Melynk, J., Finklest, J.Z., Adams, E.C. and Gardner, M.B. (1969): Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer*, 24, 520-526.

Müller, R., Slamlom, D.J., Tremblay, J.M., Cline, M.J. and Verma, I.M. (1982): Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal development of the mouse. *Nature*, 299, 640-644.

Müller, R. (1983): Differential expression of cellular oncogenes during murine development and in teratocarcinoma cell lines. *Cold Spring Harbor Conf Cell Prolif* 10, 451-468.

Müller, R., Verma, I.M. and Adamson, E.D. (1983): Expression of c-onc genes: c- fos transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac and amnion. *EMBO J.*, 2, 679-684.

Müller, R., Tremblay, I.M., Adamson, E.D. and Verma, I.M. (1983b): Tissue and cell type-specific expression of two human c-onc genes. *Nature*, 304, 454-456.

Müller, R. and Verma, I.M. (1984): Expression of cellular oncogenes. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 112, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 73-115.

Müller, R. and Wagner, E.F. (1984): Differentiation of F 9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos proto-oncogenes. *Nature*, 311, 438-442.

Müller, R., Müller, D. and Guilbert, L. (1984a): Differential expression of c- fos in hematopoietic cells: correlation with differentiation of monomyelocytic cells in vitro. *EMBO J.*, 3, 1887-1890.

Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J. and Curran, T. (1984b): Induction of c- fos gene and protein by growth factors precedes activation of c- myc. *Nature*, 312, 716-720.

Müller, R., Curran, T., Müller, D. and Guilbert, L. (1985): Induction of c- fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation. *Nature*, 314, 546-548.

Neel, B.G., Hayward, W.S., Robinson, H.L., Fang, J. and Astrin, S.M. (1981): Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell*, 23, 323-334.

Nishimura J., Huang J.S., Deuel T.F., (1982): Platelet Derived Growth Factor stimulates tyrosin specific protein Kinase activity in Swiss 3T3 cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci* 74, 4303-4307.

Nister, M., Heldin, C.-H., Wasteson, A. and Westermark, B. (1984): A glioma-derived analog to platelet-derived growth factor: demonstration of receptor competing activity and immunological cross-reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 926-930.

Nusse, R. and Varmus, H.E. (1982): Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31, 99-109.

Owen, A.J., Pantazis, P. and Antoniades, H.N. (1984): Simian sarcoma virus-transformed cells secrete a mitogen identical to platelet-derived growth factor. *Science* 225, 54-56.

Pantazis, P., Pelicci, P.G., Dalla-Favera, R. and Antoniades, H.N. (1985): Synthesis and secretion of proteins resembling platelet-derived growth factor by human glioblastoma and fibrosarcoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2404-2408.

Parada, L.D., Tabin, C.J., Shih, C. and Weinberg, R.A. (1982): Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, 297, 474-478.

Pike, L.J., Gallis, B., Casnellie, J.E., Bornstein, P. and Krebs, E.G. (1982): Epidermal growth factor stimulates the phosphorylation of synthetic tyrosine-containing peptides by A431 cell membranes. *Proc. Nat. Acad. USA* 79, 1443-1447.

Pike, L.J., Bowen-Pope, D.F., Ross, R. and Krebs, E.G. (1983): Characterization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation in cell membranes. *J. Biol. Chem.* 258, 9383-9390.

Rainer Brachmann (1987): Untersuchungen zur Aktivität des SIS-Onkogens in menschlichen Sarkomen. Ludwig-Maximilians-Universität München

Raines, E.W. and Ross, R. (1982): Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J. Biol. Chem.* 257, 5154-5160.

Ramsay, G., Evan, G.I. and Bishop, M. (1984): The protein encoded by the human proto-oncogene c- myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7742-7746

Rasheed, S., Nelsonre, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P. and Gardner, M.B. (1974): Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, 33, 1027-1033.

Roberts, A.B., Anzano M.A., Wakefield L.M., Roche N.S., Stern D.F., and Sporn M.D.. (1985): Type β transforming growth factor : A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82, 119-123.

Robbins, K.C., Antoniades, H.N., Devare, S.G., Hunkapiller, M.W., and Aaronson, S.A. (1983): Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. *Nature* 305, 605-608.

Robbins, K.C., Leal, F., Pierce, J.A. and Aaronson, S.A. (1985): The v-sis/PDGF-2 transforming gene product localizes to cell membranes but is not a secretory protein. *EMBO J.* 4, 1783-1792.

- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L. (1974):** A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1207-1210.
- Ryo, R., Nakeff, A., Huang, S.S., Ginsberg, M. and Deuel, T.F. (1983):** New synthesis of a Platelet-specific Protein: Platelet factor 4 synthesis in Megacaryocyte enriched Bone Marrow Culture System. *J. Cell. Biol.*, 96, 515-520.
- Santos, E., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., Pulciani, S. and Barbacid, M. (1982):** T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature*, 298, 343-347.
- Scher, C. D., Shepard, R.C., Antonlades, H.N. and Stiles, C.D. (1979):** Platelet-derived growth factor and the regulation of the mammalian fibroblast cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta*, 560, 217-241.
- Selfert, R.A., Schwartz, S.M. and Bowen-Pope, D.F. (1984):** Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature*, 311, 669-671.
- Sheiness, D.K., Huges, S.H., Varmus, H.E., Stubblefield, E. and Bishop, J.M. (1980):** The vertebrate homolog of the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus: characteristics of the DNA locus and its RNA transcript. *Virology*, 105, 415-424.
- Shih, C., Ben-Zion, S., Goldfarb, M.P., Dannenberg, A. and Weinberg, R.A. (1979):** Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5714-5718.
- Shilo, B.Z. and Weinberg, R.A. (1981):** DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6789-6792.
- Shimokado, K., Raines, E.W., Madtes, D.K., Barrett, R.B., Benditt, E.P. and Ross, R. (1985):** A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell*, 43, 277-286.
- Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., Perucho, M., Li, Y., Kamata, T., Feramisco, J., Stavnezer, E., Fogh, J. and Wigler, H. (1983):** Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2112-2116.
- Singh, J.P., Chaikin, M.A. and Stiles, C.D. (1982):** Phylogenetic analysis of platelet-derived growth factor by radio-receptor assay. *J. Cell Biol.* 95, 667-671.
- Smith, J.C., Singh, J.P., Lillquist, J.S., Goon, D.S. and Stiles, C.D. (1982):** Growth Factors adherent to cell substrate are mitogenically active in situ. *Nature* 296, 154-156.
- Slamon, Dennis J., de Kernion, Jean B., Verma, Inder M., Cline, Martin J. (1984):** Expression of Cellular Oncogenes in Human Malignancies. *Science* 224, 256-262.
- Southern, E. (1975):** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.

Sporn, M.B. and Todaro, G.J. (1980): Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.*, 303, 878-880.

Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J. and Pledger, W.J. (1979): Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. *Prod. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 1279-1283.

Stiles, C.D. (1983): The molecular biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 33, 653-655.

Stroobant, P. and Waterfield, M.D. (1984): Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 3, 2963-2967.

Swan, D.C., McBride, O.W., Robbins, K.C., Keithley, D.A., Reddy, E.P. and Aaronson, S.A. (1982): Chromosomal mapping of the simian sarcoma virus onc gene analogue in human cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79, 4691-4695.

Tabilio, A., Rosa, J.P., Testa, U., Kieffer, M., Nurden, A.T., Del Canizo, M.C., Breton-Gorius, J. and Valchenker, W. (1984): Expression of platelet membrane glycoproteins and α -granule proteins by a human erythroleukemia cell line (HEL) *EMBO J.* 3, 453-459.

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, C., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S. and Leder, P. (1982): Translocation of the c- myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7837-7841.

Thellen, G.H., Gould, D., Fowler, M. and Dungworth, D.L. (1971): C-type virus in tumor tissue of a woolly monkey (*Lagothrix* spp.) with fibrosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47, 881-889.

Thiel, H.-J., and Hafenrichter, R. (1984): Simian Sarcoma virus transformation-specific glycopeptide: immunological relationship to human platelet-derived growth factor. *Virology* 136, 414-424.

Todaro G. J. and De Larco, J. E. (1978). *Cancer Res.* 38, 4147-4154

Van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Müller, R. and Verma, I.M. (1983): Analysis of FBJ-MuSV provirus and c- fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell*, 32, 1241-1255.

Van Straaten, F., Müller, R., Curran, T., Van Beveren, D. and Verma, I.M. (1983): Complete nucleotide sequence of a human c- onc gene: deduced amino acid sequence of the human c- fos gene protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3183-3187.

Walker, L.N., Bowen-Pope, D.F. and Reddy, M.A. (1984): Secretion of platelet-derived growth-factor (PDGF)-like activity by arterial smooth-muscle cells is induced as a response to injury. *J. Cell. Biol.*, 99, 416a.

Waterfield, M.D., Scrase, G.T., Whittle, N., Stroobant, P., Johnsson, A., Wasteson, A., Westermark, B., Heldin, C.H., Huang, J.S. and Deuel, T.F. (1983): Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature*, 304, 35-39.

Weinberg, R.A. (1982): Oncogenes of spontaneous and chemically-induced tumors. *Adv. Cancer Res.*, 36, 149-163.

Westermark, B. and Wasteson, A. (1976): A platelet factor stimulating normal human glial cells. *Exp. Cell. Res.*, 98, 170-174.

Westermark, B., Heldin, C.-H., Ek, B., Johnsson, A., Mellström, K., Nister, M. and Wasteson, A. (1983): Biochemistry and biology of platelet-derived growth factor. In *Growth and Maturation Factors*, G. Gurao, ed. (New York: John Wiley and Sons). pp. 73-115.

Westlin, E.H., Wong-Staal, F., Gelmann, E.P., Dalla-Favera, R., Papas, T.S., Lautenberger, J.A., Eva, A., Reddy, E.P., Tronick, S.R., Aaronson, S.A. and Gallo, R.C. (1982b): Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2490-2494.

Wolfe, L.G., Deinhardt, F., Theilen, G.H., Rabin, H., Kawakami, T. and Bustad, L.K. (1971): Induction of tumors in marmoset monkeys by simian sarcoma virus, type 1 (Lagothrix). A preliminary report. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47, 1115-1120.

Wolfe, L.G., Smith, R.K. and Deinhardt, F. (1972): Brief communication. Simian sarcoma virus, type 1 (Lagothrix): focus assay and demonstration of non-transforming associated virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 48, 1905-1908.

Wong-Staal, F., Dalla-Favera, R., Gelmann, E.P., Manzari, V., Szala, S., Josephs, S.F. and Gallo, R.C. (1981): The v- sis transforming gene of simian sarcoma virus is a new onc gene of primate origin. *Nature*, 294, 273-275.

MEIN BESONDERER DANK GILT:

Herrn Priv. Doz. Dr. K. von der Helm für die Überlassung des
Themas, die Betreuung, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz,
die wertvollen Anregungen und die Korrektur der Arbeit;

den Mitarbeitern seines Labors, insbesondere Frau Dietlind Rose
sowie Herrn Dr. Rainer Brachmann für viele Tips und Anregungen;

Herrn und Frau Gerd und Gabriele Schmidt, Frau Barbara Zeller,
Frau Anja Sichart für ihr Interesse und ihre Unterstützung bei
der Fertigstellung der Studie;

nicht zuletzt Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt für sein Interesse,
die freundliche Übernahme des Koreferates, sowie die
Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut.

Lebenslauf

Name: Claus Fahrer

Geburtsdatum: 18.Sept.1958

Vater: Maximilian Fahrer, Dipl. Ing.

Mutter: Clementine Fahrer, geb. Meltzow

Schul Ausbildung: Grunds chule Landau/Pfalz 1965
Deutsche Schule Teheran 1966-1967
Grunds chule Miesbach 1967-1969
Gymnasium Miesbach 1969-1971
Deutsche Schule Paris 1971-1973
Deutsche Schule Teheran 1973-1975
Gymnasium Miesbach 1975-1979
Abitur 1979

Studium: TU M nchen Maschinenbau 1979-1980
LMU M nchen Philosophie 1980
TU M nchen Chemie 1980-1981
LMU M nchen Medizin 1981-1987

rztliche Pr fung: 12.05.1987

Approbation als Arzt: 25.05.1987

Arbeitsstellen: Max von Pettenkofer Institut der LMU
M nchen als wissenschaftlicher
Angestellter: Aug.87-Nov.87

Med. Klinik Innenstadt der LMU M nchen
als wissenschaftlicher Angestellter
seit Dez. 87

